



## [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 03824895.6

[43] 公开日 2005 年 11 月 16 日

[11] 公开号 CN 1697659A

[22] 申请日 2003.9.4 [21] 申请号 03824895.6

[30] 优先权

[32] 2002. 9. 4 [33] US [31] 60/408,126

[86] 国际申请 PCT/US2003/027841 2003.9.4

[87] 国际公布 WO2004/021994 英 2004.3.18

[85] 进入国家阶段日期 2005.4.30

[71] 申请人 生物聚合物工程有限公司

地址 美国明尼苏达州

共同申请人 路易斯维尔大学研究基金会

[72] 发明人 加里·R·奥斯罗夫

戈登·D·罗斯

[74] 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

代理人 过晓东

权利要求书 3 页 说明书 46 页 附图 19 页

[54] 发明名称 使用全葡聚糖颗粒和抗体治疗癌症的方法

[57] 摘要

本文涉及使用全葡聚糖颗粒和可激活补体的抗体治疗癌症的方法。全葡聚糖颗粒通过与 C3 补体蛋白受体 CR3 相结合而加强先天免疫系统杀灭肿瘤的活性。这种结合可增强先天免疫系统的细胞毒性，并刺激活性细胞因子的释放。

1. 一种抑制或消灭肿瘤细胞的方法，该方法包括对需要治疗的个体使用治疗有效剂量的不溶性全葡聚糖颗粒以及至少一种可激活补体的抗肿瘤抗体，其中葡聚糖和抗体抑制或消灭肿瘤细胞。
2. 如权利要求1中所述的方法，其中的抗体是通过直接使用单克隆抗体或多克隆抗体而引入的，或者是个体通过癌症疫苗所产生的。
3. 如权利要求1中所述的方法，其中的抗体选自：曲妥单抗、美罗华、西妥昔单抗以及这些单抗的组合物。
4. 如权利要求1中所述的方法，其中全葡聚糖颗粒和抗体形成协同疗效。
5. 如权利要求1中所述的方法，其中全葡聚糖颗粒通过口服方式进行给药。
6. 如权利要求1中所述的方法，其中全葡聚糖颗粒通过注射方式进行给药。
7. 如权利要求1中所述的方法，其中全葡聚糖颗粒由酵母衍生出来。
8. 如权利要求1中所述的方法，其中全葡聚糖颗粒由植物或真菌衍生出来。
9. 如权利要求8中所述的方法，其中的植物是大麦。

10. 如权利要求 8 中所述的方法，其中的真菌是蘑菇。
11. 全葡聚糖颗粒和能够激活补体的抗体制造用于治疗赘生细胞的药物的应用，其中全葡聚糖颗粒和激活补体抗体的联合使用将阻碍赘生细胞的生长。
12. 一种治疗赘生细胞的方法，该方法包括对所述细胞使用有效剂量的全葡聚糖颗粒以及可激活补体的抗体，其中的抗体对赘生细胞具有特异性。
13. 如权利要求 12 中所述的方法，其中葡聚糖和激活补体抗体的联合使用将阻碍赘生细胞的生长。
14. 如权利要求 12 中所述的方法，其中葡聚糖和激活补体抗体的联合使用将阻止赘生细胞的生长。
15. 如权利要求 12 中所述的方法，其中葡聚糖和激活补体抗体的联合使用将延长赘生细胞宿主的存活期。
16. 如权利要求 1 中所述的方法，其中激活补体的抗体包裹住肿瘤细胞，并通过 iC3b 在肿瘤细胞上的沉积而激活补体。
17. 如权利要求 16 中所述的方法，其中全葡聚糖颗粒被巨噬细胞所吸收和降解，降解后形成的片段与骨髓中的中性粒细胞相结合，并通过趋化性而迁移到抗体覆盖的肿瘤细胞上并与肿瘤细胞相结合，其中肿瘤细胞上的补体已经通过 iC3b 在肿瘤细胞上的沉积所激活。

18. 一种抑制或消灭肿瘤细胞的方法，该方法包括对需要治疗的个体使用有效剂量的不溶性全葡聚糖颗粒，其中全葡聚糖颗粒被巨噬细胞所吸收和降解，降解后形成的片段与骨髓中的中性粒细胞相结合，并通过趋化性而迁移到抗体覆盖的肿瘤细胞上并与肿瘤细胞相结合，其中肿瘤细胞上的补体已经通过 iC3b 在肿瘤细胞上的沉积而被天然存在的能够激活补体的抗体所激活。

## 使用全葡聚糖颗粒和抗体治疗癌症的方法

### 相关申请

本申请要求 60/408, 126 号美国临时申请的权益, 60/408, 126 号美国临时申请于 2002 年 9 月 4 日提交, 该临时申请的全文在此通过引证被并入本文。

### 政府支持

本发明全部或部分地得到了美国国家健康协会/美国国家癌症协会的 RO1CA86412 号拨款和美国国防部及美国陆军 BC010287 号拨款的支持。美国政府享有本发明的某些权利。

### 发明背景

$\beta$ -葡聚糖是一种复合糖,  $\beta$ -葡聚糖通常可从几种物质衍生出来, 这些物质包括酵母、细菌、真菌和谷物。这些来源可产生各种混合的  $\beta$ -葡聚糖、各种纯的  $\beta$ -葡聚糖以及各种结构的  $\beta$ -葡聚糖。 $\beta$ -葡聚糖的结构差异是由葡萄糖以不同方式而结合成具有不同化学性质和物理性质的化合物而造成的。举例而言, 由细菌和藻类物质衍生出的  $\beta$  (1-3) 葡聚糖是线性葡聚糖, 因此这种葡聚糖可用作食品增稠剂。蘑菇多糖 (由担子菌纲科的香菇衍生出来) 是一种高分子量  $\beta$ -葡聚糖, 这种葡聚糖的 (1,3) 骨架上带有  $\beta$  (1,6) 支链。裂殖菌多糖 (由提子菌纲科的裂褶菌衍生出来) 也是类似的葡聚糖, 但裂殖菌多糖的  $\beta$  (1,6) 侧链更短。大麦、燕麦或小麦所衍生出的  $\beta$ -葡聚糖在其骨架中带有 (1,3)

和(1,4)混合的连接键,但没有(1,6) $\beta$ 支链,而且这些葡聚糖的分子量通常比较高。葡聚糖的侧链频率被称为置换程度或分支频率,侧链频率决定着葡聚糖的二级结构和溶解性。酵母衍生出的 $\beta$ -葡聚糖带有通过 $\beta$ (1-3)键连接起来的葡萄糖骨架,骨架上的葡萄糖单元带有较低程度的分子内和分子外支链,这些支链通过 $\beta$ (1-6)键和骨架相连。从已经公布的大量研究结果看,在纯度和活性方面,面包酵母(酿酒酵母)被广泛地公认为 $\beta$ (1-3)葡聚糖的优选来源。

酿酒酵母的细胞壁主要由 $\beta$ -葡聚糖构成,这一点决定着酿酒酵母细胞壁的形状和机械强度。虽然酵母最常见的用途是用作食品级微生物,但酵母也是酵母多糖的来源,酵母多糖是一种不溶性的原提取物,它被用来刺激非特异性免疫反应。酵母多糖是一种丰富的 $\beta$ (1-3)葡聚糖来源。酵母衍生出的 $\beta$ (1,3)葡聚糖在一定程度上是通过激活先天抗真菌免疫机制来抵御各种目标,从而刺激免疫系统。面包酵母衍生出的 $\beta$ (1-3)葡聚糖是一种基本上由 $\beta$ (1-3)键连接的葡萄糖分子组成的多糖,这种多糖骨架上每隔一段就带有通过 $\beta$ (1-6)键连接起来的 $\beta$ (1-3)支链。这种多糖更正式地被称为聚-(1-6)- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖基-(1-3)- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖。当来源和分离方法不同时,葡聚糖的结构和功能是不同的。

$\beta$ -葡聚糖具有多种活性。 $\beta$ -葡聚糖提高非特异性免疫力和增强抗感染的能力与内毒素相似。当 $\beta$ -葡聚糖作为免疫辅助剂和造血刺激剂时,其活性可与诸如长芥苗和粉刺丙酸菌这些更复杂的生物反应改性物的活性相比。酵母 $\beta$ -葡聚糖的功能活性与那些从真菌和植物分离出来的并且在结构上类似碳水聚合物的功能活性也是可比的。诸如裂殖菌多糖、蘑菇多糖、云芝多糖、灰树花多糖和茯苓多糖这些分子量高的(1-3)- $\beta$ -D-葡聚糖表现

出了相似的免疫调节活性。研究人员就颗粒型葡聚糖和可溶性葡聚糖的各种剂型在动物模型中进行了试验,从而说明这些生物活性。单独使用可溶性 $\beta$ -葡聚糖和单独使用不溶性 $\beta$ -葡聚糖或将 $\beta$ -葡作为病毒疫苗或细菌疫苗的辅剂都可以显著提高使用者对多种细菌、真菌、原生动物以及病毒感染的抵抗力。 $\beta$ -葡聚糖在造血方面的功能包括可以增加外周血中白细胞的数量和骨髓以及脾细胞质,增加粒性白细胞-巨噬细胞祖细胞的数量、脾多能性干细胞的数量、红色祖细胞数量以及血清中性粒白细胞-单核细胞集落剂刺激因子的水平。

$\beta$ -葡聚糖作用的分子机理涉及免疫细胞膜上特异性 $\beta$ -葡聚糖受体结合位点,比如涉及中性粒细胞和巨噬细胞这些免疫细胞细胞膜上的 $\beta$ -葡聚糖特异性受体结合位点。甘露多糖、半乳糖、 $\alpha$  (1-4) 键葡萄糖聚合物以及 $\beta$  (1-4) 键葡萄糖聚合物对该受体没有亲和力。最近的研究数据表明, C3 补体蛋白的受体 CR3 是 $\beta$ -葡聚糖的主要受体。与 $\beta$ -葡聚糖受体相结合的配体可以激活补体,触发吞噬作用、溶酶体酶的释放、前列腺素的生成、促凝血素的生成以及白细胞三烯的生成。以前技术所述的大多数 $\beta$ -葡聚糖制剂可刺激细胞因子的产生,比如白细胞间素-1 和肿瘤坏死因子的产生,这些细胞因子具有抗肿瘤活性。

正如日本医药文献中所述的,有关 $\beta$ -葡聚糖潜在的抗癌活性研究已经进行了约 30 年。举例而言,自上世纪 70 年代末开始,研究人员在动物体内和临床上对蘑菇多糖进行了广泛的研究,其中动物实验的用药时间为 10 天,用药量为 1 毫克/公斤;临床试验是针对早期及复发性恶性淋巴瘤、结肠直肠癌、乳癌、肺癌和胃癌进行的。最近的报道对这项工作进行了回顾,其主要内容是有关从蘑菇中分离出来的 $\beta$ -葡聚糖(见 Borchers AT.等人在《蘑菇与免疫》上发表的文章, 221 (4), 281 (1999))。这项研究工

作表明,从蘑菇中分离出的多糖的抗癌活性在很大程度上是由T细胞和巨噬细胞介导的,而T细胞和巨噬细胞由 $\beta$ -葡聚糖所激活。从原酵母和谷物制品中分离出的 $\beta$ -葡聚糖也表现出了抗癌活性。这些研究工作所使用的是原 $\beta(1,3)$ 葡聚糖制品,其中原 $\beta(1,3)$ 葡聚糖制品是 $\beta(1,3)$ 葡聚糖与其他诸如 $\beta$ -葡聚糖、甘露聚糖、壳多糖/脱乙酰壳多糖、 $\beta(1,4)$ 葡聚糖、核酸、蛋白质以及脂质这些多糖物质的混合物。 $\beta(1,3)$ 葡聚糖在这些制品中所占的重量比通常小于50%。不同种类的葡聚糖在诱导各种细胞反应的能力以及在抗具体癌症的活性上是不同的,尤其在细胞因子表达和细胞因子产生方面存在着差异。人们认为, $\beta$ -葡聚糖的抗癌机理涉及到巨噬细胞的刺激以及此后炎症介质的释放,比如白细胞间素-1、肿瘤坏死因子以及前列腺素E2的释放(见Sveinbjörnsson等人在《生物化学生物物理学研究通讯》上发表的文章,223(3),643(1996))。

与癌症生长相关的细微变化会导致表面蛋白的表达不同,这可以刺激适应性免疫系统做出微弱的反应。表面抗原表达所出现的这些变化还提供了治疗的靶目标,其中的治疗使用选择性单克隆抗体或抗癌疫苗。已开发出的单克隆抗体以在结肠癌、淋巴瘤、乳腺癌以及急性白血病中表达的各种蛋白为靶目标。肿瘤对单克隆抗体的临床反应的免疫基础包括直接细胞毒性和诱导免疫,其中抗体依赖型细胞介导细胞毒性和补体介导细胞毒性可直接杀灭肿瘤细胞。然而,人们已经注意到,天然抗体或单克隆抗体介导的补体活性的增强对肿瘤的生长几乎没有影响,其原因在于肿瘤对于补体介导的细胞毒性具有固有的耐受性,这一事实经常会使单克隆抗体或肿瘤抗原疫苗丧失疗效。

人们越来越认识到,免疫系统有效地破坏肿瘤需要多种效应机理的协同作用,单一一种疫苗、细胞因子或生物学应答调节物



不可能在众多患者中取得成功。举例而言，疫苗可诱导免疫细胞毒性 T 淋巴细胞反应和/或体液抗体反应，但这两种反应都存在缺陷。抗体通常是无效的，因为诸如 DAF、MCP 以及 CD59 这样的正常宿主细胞蛋白会抑制补体介导的细胞毒性，而且 iC3b 对肿瘤的调理作用并非只是吸收巨噬细胞或天然杀伤细胞。抗体依赖性细胞介导的免疫力被认为是无效的，因为肿瘤上免疫球蛋白 G 浓度太低以及抗体 FC 片段介导的细胞毒性受到天然杀伤细胞对 I 型 MHC 肿瘤细胞识别作用的抑制。所以做为转移过程的一部分，由于肿瘤通常会失去抗原表达所需的主要组织相容性复杂分子，所以使用细胞毒性 T 淋巴细胞的细胞介导免疫性也存在缺陷。因此，需要一种组合抗癌疗法，这种组合抗癌疗法将克服这些缺陷。

## 发明概述

本申请对抗肿瘤疗法进行了说明，在该肿瘤疗法中，不溶性  $\beta$ -葡聚糖和激活补体的肿瘤特异性抗体联合使用，从而达到抗肿瘤的效果。不溶性  $\beta$  (1, 3) 葡聚糖（在本文中也称为全葡聚糖颗粒）通过与 C3 补体蛋白的受体 CR3 相结合来加强免疫系统杀灭肿瘤的活性。在优选实施方案中，该方法形成协同效应。这种协同效应在一定程度上来自于抗体能够有选择性地以肿瘤细胞作为靶细胞。 $\beta$ -葡聚糖通过 C3 的沉积来放大正常情况下较弱的体液反应或无效的体液反应，C3 的沉积是由瞄准肿瘤细胞的抗体所引发的，带有  $\beta$ -葡聚糖启动过的 CR3 的先天免疫细胞可识别肿瘤细胞。

本申请公开，全葡聚糖颗粒增强肿瘤抗原单克隆抗体疗法和抗肿瘤疫苗所刺激的抗肿瘤免疫活性。细胞表面单克隆抗体和肿瘤疫苗刺激复杂的抗肿瘤免疫反应，该免疫反应包括非特异性免疫反应和特异性免疫反应。非特异性免疫反应涉及先天免疫细胞

因子（比如补体系统）和细胞（树突细胞、单核细胞、巨噬细胞、中性粒细胞和天然杀伤细胞）。以肿瘤抗原为靶目标的单克隆抗体和肿瘤疫苗刺激产生的抗体与肿瘤细胞的表面相结合，并以肿瘤细胞为靶目标，从而满足补体直接作用和补体介导细胞毒性的需要。

抗体介导的杀灭肿瘤细胞机理的核心部分涉及到 C3 补体蛋白对抗体-肿瘤抗原络合物的识别以及 C3-抗体肿瘤抗原络合物的形成。该络合物被先天免疫细胞通过 CR3 所识别。带有 CR3 受体的先天免疫细胞通过 CR3 和 C3-抗体肿瘤细胞抗原络合物之间的特异性反应与肿瘤细胞相结合，但先天免疫细胞不将肿瘤细胞认作是异物，也不会随后引发杀灭肿瘤的活性。当 CR3 与该络合物相结合时，先天免疫细胞受到刺激，从而发挥其杀灭肿瘤的活性。在本发明中，这些先天免疫细胞还受到全葡聚糖颗粒的刺激。当  $\beta(1,3)$ -葡聚糖在单核细胞、巨噬细胞、中性粒细胞和天然杀伤细胞的表面与 CR3 相结合后，这些细胞便处于激活状态。 $\beta(1,3)$ -葡聚糖与 CR3 间的相互作用对这些细胞的激活作用增强了这些细胞以 C3-抗体-肿瘤细胞抗原络合物为靶目标的杀灭肿瘤活性，从而通过协同效应加强了杀灭肿瘤的能力。

本发明的一个新方面是全葡聚糖颗粒与细胞表面单克隆抗体和/或肿瘤疫苗的共同作用下所产生的协同抗肿瘤活性，以全葡聚糖颗粒形式存在的  $\beta(1,3)$  葡聚糖的优势在于可以容易地从任何  $\beta(1,3)$  葡聚糖来源制备出高纯度的这种葡聚糖。此外，人们还发现口服全葡聚糖颗粒对目标位点也具有生物活性。将全葡聚糖颗粒用作抗肿瘤药剂有多个重要的方面。第一，使用高纯全葡聚糖颗粒可使葡聚糖的活性更高、副作用更少。第二，一旦全葡聚糖颗粒降解便可以与凝集素的 CR3 结合区相结合，从而

激活先天免疫细胞的杀灭肿瘤活性。通过使用补体沉积所产生的定向激活作用， $\beta$  葡聚糖通过直接细胞毒性作用以及细胞因子介导的局部补充免疫细胞而提高免疫系统清除肿瘤的能力。

本文还对抑制或杀灭肿瘤细胞的方法进行了说明，这些方法包括对需要治疗的个体使用有效治疗剂量的全葡聚糖颗粒以及以肿瘤细胞的抗原为靶目标的抗体。这些抗体是可以激活补体的抗体。在某些实施方案中，这些抗体是 I 亚型免疫球蛋白 G 或 III 亚型亚型免疫球蛋白 G。通过使用适当的疫苗也可在患者体内诱导出这些抗体，也可以通过直接使用单克隆抗体或多克隆抗体而提供抗体，比如通过静脉注射单克隆抗体的方式而直接提供抗体。另外，抗体也可以是个体内自然存在的抗体。在某些实施方案中，全葡聚糖颗粒和抗体形成协同效应。不溶性  $\beta$  (1, 3) 葡聚糖可通过口服、注射或本领域所知的其他方式进行给药。

在某些实施方案中，抑制或杀灭肿瘤细胞的方法包括对需要治疗的个体使用有效治疗剂量的全葡聚糖颗粒以及至少一种激活补体的抗肿瘤抗体，其中葡聚糖和抗体的联合使用可抑制或杀灭肿瘤细胞。抗体通过直接使用单克隆抗体或多克隆抗体而得到，或者由癌症疫苗产生。在具体的实施方案中，抗体选自于曲妥单抗、美罗华、西妥昔单抗以及这些抗体的组合物。全葡聚糖颗粒可通过口服或注射方式进行给药。在某些实施方案中，全葡聚糖颗粒可由酵母、真菌（比如蘑菇）或诸如大麦这样的谷物产生。

在其他实施方案中，全葡聚糖颗粒和抗体形成协同的抗肿瘤效应。

本文还对使用激活补体的抗体制造治疗赘生细胞药物的方法进行了说明，全葡聚糖颗粒和抗体的协同作用会减缓赘生细胞的生长。

在另一实施方案中，治疗赘生细胞的方法包括对赘生细胞使用有效治疗剂量的全葡聚糖颗粒以及激活补体的抗体，这种激活补体的抗体对赘生细胞具有特异性。在某些实施方案中，全葡聚糖颗粒和抗体的协同作用会保护赘生细胞的宿主，并通过减缓赘生细胞的生长速度和/或抑制赘生细胞的生长和/或延长赘生细胞宿主的存活时间而发挥作用。

在其他实施方案中，抑制或杀灭赘生细胞的方法包括对需要治疗的个体使用有效治疗剂量的全葡聚糖颗粒以及至少一种激活补体的抗肿瘤抗体，全葡聚糖颗粒和抗体的协同作用会抑制或杀灭肿瘤细胞，这种激活补体的抗体包裹住肿瘤细胞，并通过 iC3b 在肿瘤细胞上的沉积来激活补体。全葡聚糖颗粒被巨噬细胞所吸收，并被降解；降解后的片段与骨髓中的中性粒细胞相结合，并在趋化性作用下向抗体包裹的肿瘤细胞运动并与之相结合，其中被抗体包裹的肿瘤细胞上的补体通过沉积在肿瘤细胞上的 iC3b 所激活。

本文还对抑制或杀灭肿瘤细胞的方法进行了说明，该方法包括对需要治疗的个体使用有效治疗剂量的不溶性全葡聚糖颗粒，全葡聚糖颗粒被巨噬细胞所吸收，并被降解；降解后的片段与骨髓中的中性粒细胞相结合，并在趋化性作用下向抗体包裹的肿瘤细胞运动并与之相结合，其中被抗体包裹的肿瘤细胞上的补体由自然存在的激活补体的抗体通过沉积在肿瘤细胞上的 iC3b 所激活，其中葡聚糖与 iC3b 的结合可以抑制或杀灭肿瘤细胞。

## 图示简介

通过下面对本发明优选实施方案进行更详细说明，可以清楚地了解前面所述的本发明目标、特点和优势以及本发明其他的目标、特点和优势，本文所附的图形对这些优选实施方案进行了图解说明。

图 1 表明的是 C3 调理的酵母在激活 CR3 时同时需要 iC3b 和  $\beta$ -葡聚糖与凝集素位点相结合。

图 2 表明的是缺乏细菌的  $\beta$ -葡聚糖并不通过 CR3 触发吞噬作用或脱粒作用。

图 3 表明的是降解为可溶性葡聚糖的全葡聚糖颗粒与 CR3 相结合并启动受体，从而触发细菌的脱粒和解体或 iC3b 的肿瘤靶细胞的脱粒和解体。

图 4 表明的是启动鼠源性中性粒细胞 CR3 的  $\beta$ -葡聚糖可使 iC3b 调理的乳腺肿瘤细胞在此后触发细胞毒性。

图 5A-5D 表明的是乳房肿瘤患者的肿瘤细胞针对免疫球蛋白 M、免疫球蛋白 G 或 C3 所做的双色流式细胞检测分析。图 5A 是抗老鼠-免疫球蛋白 G-PE/MIG-异硫氰酸荧光素的图形。图 5B 是抗 MUC1-PE/抗免疫球蛋白 M-异硫氰酸荧光素的图形。图 5C 是抗 MUC1-PE/抗免疫球蛋白 M-异硫氰酸荧光素的图形。图 5D 是抗 MUC1/抗 C3-异硫氰酸荧光素的图形。

图 6 表明的是新切除的原发乳腺肿瘤细胞的悬浮液中含有足够的 C3，同种基因的天然杀伤细胞对肿瘤细胞的识别需要足够的 C3，其中的天然杀伤细胞带有  $\beta$ -葡聚糖启动的 CR3。

图 7 表明的是  $\beta$ -葡聚糖对 Balb/c 小鼠 Ptas64 乳腺癌的治疗结果。

图 8 表明的是  $\beta$ -葡聚糖在治疗缺乏血清 C 3 或白细胞 CR3 的小鼠时失效的情况。

图 9 表明的是使用  $\beta$ -葡聚糖可增强抗肿瘤单克隆抗体疗法对 EL-4 肝淋巴瘤的疗效。

图 10 表明的是在治疗裸小鼠体内人类 LAN-1 成神经细胞瘤时，抗体和口服大麦  $\beta$ -葡聚糖所取得的协同疗效。

图 11 表明的是在静脉注射单克隆抗体加口服不溶性酵母  $\beta$ -葡聚糖颗粒的情况下 Balb/c 小鼠乳腺癌的治疗结果。

图 12 表明的是单克隆抗体加口服全葡聚糖颗粒疗法的杀灭肿瘤活性需要通过白细胞三烯受体 B4 吸收白细胞。

图 13 表明的是  $\beta$ -葡聚糖刺激天然杀伤细胞分泌肿瘤坏死因子  $\alpha$  和 CR3 依赖性刺激天然杀伤细胞分泌肿瘤坏死因子  $\alpha$ 。

图 14A-图 14B 表明的是口服酵母全  $\beta$ -葡聚糖颗粒可加强肿瘤的消退，其中图 14A 表明的是肿瘤直径与植入肿瘤细胞之后天数之间的关系；图 14B 表明的是在静脉注射酵母  $\beta$ -葡聚糖情况下存活率与植入肿瘤细胞之后天数之间的关系。

图 15A-15D 表明的是口服可溶性大麦  $\beta$ -葡聚糖或颗粒型酵母  $\beta$ -葡聚糖所导致的肿瘤消退需要白细胞 CR3。其中图 15A 表明的是肿瘤直径（毫米）与野生型小鼠治疗天数之间的关系；其中图 15B 表明的是存活率与野生型小鼠治疗天数之间的关系；其中图 15C 表明的是肿瘤直径（毫米）与缺乏 CR3 的小鼠治疗天

数之间的关系；其中图 15D 表明的是存活率与缺乏 CR3 的小鼠治疗天数之间的关系。

图 16A-16D 表明的是口服可溶性大麦  $\beta$ -葡聚糖或颗粒型酵母  $\beta$ -葡聚糖所导致的长期无肿瘤存活需要白细胞 CR3。其中图 16A 表明的是肿瘤直径（毫米）与野生型小鼠治疗天数之间的关系；其中图 16B 表明的是存活率与野生型小鼠治疗天数之间的关系；其中图 16C 表明的是肿瘤直径（毫米）与缺乏 CR3 的小鼠治疗天数之间的关系；其中图 16D 表明的是存活率与缺乏 CR3 的小鼠治疗天数之间的关系。

图 17A-17D 表明的是口服可溶性大麦  $\beta$ -葡聚糖或颗粒型酵母  $\beta$ -葡聚糖所导致的肿瘤消退需要血清 C3。其中图 17A 表明的是肿瘤直径（毫米）与野生型小鼠治疗天数之间的关系；其中图 17B 表明的是存活率与野生型小鼠治疗天数之间的关系；其中图 17C 表明的是肿瘤直径（毫米）与缺乏 CR3 的小鼠治疗天数之间的关系；其中图 17D 表明的是存活率与缺乏 CR3 的小鼠治疗天数之间的关系。

图 18A-18D 表明的是口服可溶性大麦  $\beta$ -葡聚糖或颗粒型酵母  $\beta$ -葡聚糖所导致的长期无肿瘤存活需要血清 C3。其中图 18A-18B 表明的是存活率与野生型小鼠治疗天数之间的关系；其中图 18C-18D 表明的是存活率与缺乏 CR3 的小鼠治疗天数之间的关系。

图 19 表明的是有空白边缘的粒性白细胞库吸收可溶性  $\beta$  葡聚糖需要膜表面 CR3。

## 优选实施方案的详细说明

本申请对抗肿瘤疗法进行了说明,在该疗法中, $\beta$ -葡聚糖与瞄准肿瘤抗原的抗体结合使用,从而对赘生细胞产生抗肿瘤效果。以下将对这些葡聚糖的制备以及这些葡聚糖与抗体联合治疗赘生细胞的方法进行说明。

正如本文所述的,口服不溶性 $\beta$ -葡聚糖可诱导杀灭肿瘤的活性。这类葡聚糖能够启动循环中性粒细胞中的CR3 (iC3b受体,CD11b/CD18),从而通过单克隆抗体杀灭经iC3b调理过的肿瘤。正如本文所述的,口服大麦 $\beta$  (1-3) (1-4)葡聚糖和全葡聚糖颗粒可显著加强抗肿瘤单克隆抗体所介导的肿瘤退化和肿瘤宿主的存活情况。在CR3<sup>-</sup> (CD11b<sup>-</sup>)小鼠或缺乏C3的小鼠体内没有出现口服葡聚糖介导的肿瘤退化,这进一步表明白细胞中的CR3对与肿瘤细胞相结合的iC3b进行识别的必要性。研究人员使用全葡聚糖颗粒-荧光素对口服全葡聚糖颗粒的体内结果进行了研究。胃肠巨噬细胞将口服吸收的全葡聚糖颗粒-荧光素运送到淋巴组织,在口服全葡聚糖颗粒-荧光素3天后全葡聚糖颗粒-荧光素出现在脾巨噬细胞中,5天后出现在骨髓巨噬细胞中。由于野生型小鼠和CD11b<sup>-</sup>小鼠的骨髓巨噬细胞中含有全葡聚糖颗粒-荧光素,巨噬细胞吸收全葡聚糖颗粒-荧光素并不需要CR3。骨髓巨噬细胞消化全葡聚糖颗粒-荧光素并分泌出可溶性 $\beta$ -葡聚糖-荧光素,骨髓中性粒细胞通过CR3来吸收 $\beta$ -葡聚糖-荧光素。只有从口服全葡聚糖颗粒小鼠体中引出的中性粒细胞有能力杀灭iC3b调理过的肿瘤细胞。巨噬细胞将口服 $\beta$ -葡聚糖运送到骨髓中, $\beta$ -葡聚糖在骨髓中启动中性粒细胞的CR3,从而导致杀灭肿瘤的活性。



全葡聚糖颗粒是经过提纯的酵母细胞壁制品。通过除去酵母细胞的甘露多糖蛋白外层并保持 $\beta$ -葡聚糖体内形态的条件下使 $\beta$ -葡聚糖暴露出来就可制备出全葡聚糖颗粒。在某些实施方案中,全葡聚糖颗粒的大小在1微米或1微米以上。

另外一种形式的 $\beta$ -葡聚糖是被称为全葡聚糖颗粒的不溶性颗粒。全葡聚糖颗粒是酵母细胞壁的剩余物,通过将生长中的酵母与其生长介质分离开并用碱性物质处理这些完整的细胞壁从而去除不想要的蛋白质和核酸类物质就可制备出全葡聚糖颗粒。在某些实施方案中,剩下的是外层甘露多糖蛋白已被去除的球形 $\beta$ -葡聚糖颗粒。从含有葡聚糖的真菌细胞壁中也可以获得全葡聚糖颗粒,但优选的全葡聚糖颗粒来源是啤酒酵母。在某些实施方案中,制品中葡聚糖的含量大于50%。在某些实施方案中,制品中其余的部分由脂质和/或糖原组成。这些不溶性颗粒可增强宿主对多种感染的抵抗力,促进抗体的生成(辅助活性)、促进白细胞的运动并加快伤口的愈合。制备全葡聚糖颗粒的方法是本领域共知的,4,810,646、4,492,540、5,037,972、5,082,936、5,250,436和5,506,124号美国专利对制备全葡聚糖颗粒的方法进行了说明,这些专利的内容在此通过引证被并入本文。

在本文中,微粒型葡聚糖颗粒被定义为全葡聚糖颗粒的一部分,将酵母细胞壁 $\beta$ (1-3; 1-6)葡聚糖精细研磨到1微米左右或1微米以下便得到了微粒型葡聚糖颗粒。

人们已经制备出了各种形式的颗粒型葡聚糖。一种具体的葡聚糖就是微粒型葡聚糖颗粒。将酵母细胞壁 $\beta$ (1-3; 1-6)葡聚糖精细研磨到1微米左右或1微米以下便得到了微粒型葡聚糖颗粒。正如5,702,719号美国专利所述的,这种形式的 $\beta$ -葡聚糖被用作营养补品和皮肤修复剂。适用于本文所述方法的其他葡聚糖

包括 WGP™  $\beta$ -葡聚糖和  $\beta$  Right™, 这两种产品由明尼苏达州的生物聚合物工程公司制造。微粒型  $\beta$ -葡聚糖颗粒也具有增强使用者免疫系统的功能。见 5,223,491 号和 5,576,015 号美国专利, 这两篇专利的内容在此通过引证被并入本文。

在某些实施方案中, 本文所述方法中所用的全葡聚糖颗粒是口服生物活性成分。正如本文所使用的, “生物活性”是指全葡聚糖颗粒能够达到功效目标。换句话说就是, 全葡聚糖颗粒含有足够的  $\beta$  (1,3;1,6) 葡聚糖, 这些葡聚糖被派伊尔淋巴集节所吸收。葡聚糖被派伊尔淋巴集节所吸收, 并被巨噬细胞吞噬和降解, 然后传送到骨髓中, 降解的片段在骨髓中被释放出来。这些降解后的片段与骨髓中的中性粒细胞相结合, 并通过趋化性而迁移到抗体覆盖的肿瘤细胞上并与肿瘤细胞相结合, 其中补体已经通过 iC3b 在肿瘤细胞上的沉积所激活。举例而言, 全葡聚糖颗粒能够达到肿瘤细胞, 并同抗体一同作用于肿瘤细胞。在全葡聚糖的作用位点, 葡聚糖通过与 CR3 受体的结合而刺激细胞, 这反过来又启动或促进 CR3 发挥功能。通过胃肠巨噬细胞将全葡聚糖颗粒输送到骨髓中可以介导口服全葡聚糖的生物药效率, 胃肠巨噬细胞使全葡聚糖发生降解。降解后的颗粒然后在骨髓中发挥作用, 当中性粒细胞迁移到肿瘤细胞上并与肿瘤细胞上的 iC3b 相结合时, 这些降解的颗粒通过激活 CR3 而刺激中性粒细胞。

#### 制备全葡聚糖颗粒

简单而言, 生产全葡聚糖颗粒的过程涉及不溶于碱性物质的全葡聚糖颗粒的萃取和提纯, 其中的全葡聚糖颗粒由酵母细胞壁或真菌细胞壁制得。这一过程产生一种产品, 这一产品保持着体内葡聚糖所具有的形态和结构特性, 这一产品被称为全葡聚糖或全葡聚糖颗粒。

全葡聚糖制剂的结构-功能特性直接取决于葡聚糖的来源,同时还取决于最终产品的纯度。全葡聚糖的来源可以是酵母或其他真菌或任何其他含有葡聚糖的来源,其中的葡聚糖具有本文所述的特性,在某些实施方案中,酵母细胞是优选的葡聚糖来源。本过程所用的酵母菌株可以是任何的酵母菌株,例如包括啤酒酵母菌株、delbrueckii 菌株、rosei 菌株、微椭圆菌株、卡尔酵母菌株、二孢酵母菌株、发酵芽胞菌株、rouxii 菌株等。

一般而言,上述过程可用来将其他突变的酵母菌株与作为起始材料的其他原始菌株分离开来。此外,可采用诱变剂来诱导突变,举例而言,可使用化学诱变剂、辐射或其他脱氧核糖核酸和重组体控制手段来诱导突变。同样还可以使用其他的选择或筛分技术来制备全葡聚糖颗粒。

酵母细胞可使用本领域已知的技术加以制造。举例而言,典型的生长介质包括葡萄糖、蛋白胨以及酵母提取物。通过使用将生物物质与液体介质相分离的常规技术可以将酵母细胞与生长介质分离开,并对酵母细胞进行收集。这些方法通常使用诸如过滤或离心分离这样的固-液分离工艺。在本工艺过程中,优选的情况是在酵母细胞对数生长期的中后期对酵母细胞进行收集,从而使酵母细胞中的糖原和壳多糖含量达到最低程度。糖原、壳多糖和蛋白质是不良污染物,这些不良污染物会对全葡聚糖颗粒的生物学特性和流体力学特性造成不利影响。

制备全葡聚糖颗粒包括使用适当浓度的碱性水溶液对酵母进行处理,从而将一部分酵母溶解掉,并由此生成不溶于碱性氢氧化物的全葡聚糖颗粒,这些全葡聚糖颗粒主要含有 $\beta$  (1-6) 键和 $\beta$  (1-3) 键。在制备全葡聚糖颗粒过程中所使用的碱性物质通常为碱金属氢氧化物,比如氢氧化钠或氢氧化钾等。制备全葡聚糖所用的原料是从生长介质中分离出来的酵母。在酵母原料

浓度较低的情况下，将氢氧化物溶液的消耗量和浓度控制在理想的范围内是十分困难的。酵母应该带有完整的未出现破裂的细胞壁，因为本发明中全葡聚糖颗粒的性质是否理想取决于细胞壁是否完整。

酵母在氢氧化物水溶液中进行处理，酵母细胞的细胞内组分和甘露糖蛋白溶解于氢氧化物水溶液中，剩余的不溶性细胞壁物质基本上不含蛋白质，并含有基本上未发生改变的三维 $\beta$ （1-6）键和 $\beta$ （1-3）键矩阵的葡聚糖。在优选的操作条件下，细胞壁中的甘露聚糖成分在这一处理步骤中溶解于氢氧化物水溶液中。细胞内的组分发生水解并进入到溶解相中。对酵母进行处理的条件至少要使细胞的主要组分和细胞壁的三维结构不被破坏。在特定环境下，基本上所有的细胞壁葡聚糖未发生改变。

在某些实施方案中，使用氢氧化物水溶液对酵母进行浸泡的过程是在氢氧化物溶液的初始当量浓度约在0.1~10.0的情况下进行的。典型的氢氧化物溶液含有元素周期表中碱金属族的氢氧化化物和碱土金属的氢氧化物。由于比较容易得到，所以优选的氢氧化物水溶液是氢氧化钠水溶液和氢氧化钾水溶液。浸泡过程约在20℃~121℃的条件下进行，浸泡的温度越低浸泡的时间越长。当使用氢氧化钠水溶液时，浸泡的温度约在80℃~100℃之间，溶液的初始当量浓度约在0.75~1.5之间。所加入的氢氧化物是过量的，因此不必再添加氢氧化物。

在一般情况下，每升氢氧化物溶液所处理的干酵母数量约在10~500克之间。在某些实施方案中。使用氢氧化物水溶液浸泡酵母的过程是由一系列接触步骤实现的。在这种情况下，诸如蛋白质这些杂质的残余量要少于只使用一次浸泡的杂质残余量。在某些实施方案中，应该基本上将所有的蛋白质从细胞中除去。蛋白质的脱除程度应该使蛋白质在不溶性细胞壁葡聚糖颗粒中的残

余量低于1%。在优选条件下,还应在 pH 值约在 2.0~6.0 之间的酸性溶液中进行萃取处理。典型的酸性溶液包括盐酸、使用盐酸和醋酸盐缓冲物调制到所需 PH 值的氯化钠溶液。其他常用的酸性溶液包括硫酸溶液和含有适当缓冲剂的乙酸溶液。在优选条件下,萃取过程在约 20℃~100℃ 下进行。如果需要,经过浸泡的葡聚糖颗粒可以再进行洗涤和萃取处理。从而减少蛋白质和杂质的含量。在经过处理后,可将产物的 pH 值调节到约 6.0~7.8 之间。

在完成了这一不会对细胞壁造成破坏的处理步骤后,萃取过程可以在更严格的 pH 值和温度条件下进行,而以往的处理过程会对细胞壁造成损坏。本发明中的处理过程在采用这些严格的萃取条件时避免了产品的质量出现下降,本发明中的萃取过程消除了十分耗时的多级萃取步骤。

在经过上述氢氧化物溶液处理后,全葡聚糖最终产物的重量约为酵母原料重量的 5~30%,在优选情况下,最终产物的重约为原料重量的 7~15%。

不溶于氢氧化物溶液的全葡聚糖颗粒将在发明概述中进行说明。如果需要,全葡聚糖颗粒还可进行进一步的处理和/或提纯。举例而言,葡聚糖可干燥成细小的粉末(即在干燥炉中进行干燥),或者使用有机溶剂(比如乙醇、醚类物质、丙酮、甲乙酮、氯仿)进行处理,从而除去微量杂质或溶于有机溶剂的物质;或者再用氢氧化物溶液进行处理,从而除去可能存在的其他蛋白质或其他杂质。

在某些实施方案中,本发明工艺过程所生产出的全葡聚糖颗粒由纯葡聚糖构成,其中的葡聚糖基本是  $\beta$  (1-6) 和  $\beta$  (1-3) 键葡聚糖。全葡聚糖颗粒含有极少的蛋白质的糖原杂质。在某些实施方案中,全葡聚糖颗粒的形状为球形,直径约在 2~10 微米

之间,当使用单糖分析或其他适当的分析时,全葡聚糖所含己糖的重量比约大于 85% (在其他实施方案中己糖的重量比大于约 60%),蛋白质的重量比约为 1%,可检测到的甘露聚糖的含量小于 1%。使用以往技术所制得的葡聚糖所含壳多糖和糖原的数量大大高于本发明中的葡聚糖。

正如本文前面所述,第二步是采用化学处理手段对全葡聚糖颗粒进行改性,从而改变葡聚糖的特性。除了从本文所述的那些具体酵母菌株所衍生出的全葡聚糖颗粒外,由任何酵母菌株所衍生出的全葡聚糖颗粒均可以使用。正如前面所述的,可以使用的酵母种类很多。前面所述的处理条件同样适用于从真菌中提取葡聚糖的过程。同样,这些葡聚糖的特性也取决于它们的来源。

在第一步化学处理中,可使用酸类物质对全葡聚糖颗粒进行处理,从而减少  $\beta$  (1-6) 键的数量,并由此改变所述葡聚糖的流体力学性质,其表现结果是改性后葡聚糖水溶液的粘度会增加。

还可以使用酸性物类在适当的时间内对全葡聚糖颗粒进行处理,从而改变  $\beta$  (1-6) 键。乙酸由于其酸度适中、使用简便、毒性低、成本低及容易获得而是一种理想的酸性材料,但其他种类的酸也可以使用。一般而言,这些酸的酸度要适中,其酸度应足以限制  $\beta$  (1-3) 键发生水解。对全葡聚糖颗粒进行改性处理是在一定条件下进行的,这些条件基本上只对含  $\beta$  (1-6) 键的葡聚糖发生影响。在某些实施方案中,酸处理过程是使用基本上由乙酸组成的溶液或本文所述的稀释液(常用的稀释液可以是有机溶剂或有机酸溶液)进行的。处理过程的温度约在 20℃~100℃之间。在某些实施方案中,酸处理过程可将处理前全葡聚糖颗粒中重量约为 3~20%左右的酸溶性物质除去。在其他的实施方案中,所脱除的重量比约为 3~4%。经过酸处理后所形成的某些组

分能够表明全葡聚糖颗粒的流体力学性质已发生变化，并且表明处理后的粘度有所增加。

在第二步化学处理中，使用酶或酸对全葡聚糖颗粒进行处理，从而改变  $\beta$  (1-3) 键的数量。对于由某些酵母菌株衍生出的全葡聚糖颗粒而言，使用酶对其进行处理会使其粘度降低，但对于其他由酵母衍生出的全葡聚糖颗粒而言，酶处理过程会使这些全葡聚糖颗粒的粘度上升。但一般而言，酶处理过程会改变葡聚糖的化学性质和流体力学性质。酶处理过程是使用  $\beta$  (1-3) 葡聚糖酶对全葡聚糖颗粒进行处理，例如使用昆布糖酶对全葡聚糖颗粒进行处理，从而改变  $\beta$  (1-3) 键，并由此改变全葡聚糖水合悬浮液的流体力学性质。

酶处理过程可在全葡聚糖的水溶液中进行，其中葡聚糖的浓度约在 0.1~10.0 克/升之间。任何可水解的葡聚糖酶都可以使用，比如可使用昆布糖酶，这种糖酶十分有效并且十分容易获得。培养期可视全葡聚糖颗粒和全葡聚糖酶的浓度而变化。在诸如乙酸这样具有中等酸度的环境下， $\beta$  (1-3) 键具有抗水解能力。当使用强酸或浓酸进行处理时，比如使用盐酸、硫酸或甲酸进行处理时， $\beta$  (1-3) 键会发生水解，从而减少  $\beta$  (1-3) 键的数量。酸处理过程可在全葡聚糖的水溶液中进行，其中葡聚糖的浓度约在 0.1~10.0 克/升之间。酸处理的时间可视全葡聚糖颗粒的浓度和酸的浓度而变化。酸处理过程可在 20℃~100℃ 左右的温度下进行。在优选条件下，酸处理过程后所形成的组分可表明流体力学性质的变化。

通过控制培养时间可以控制所生成产物的化学性质和流体力学性质。举例而言，可以对产物的粘度进行精确的控制，从而使产物用于特定的用途，比如用于各种食品中。

最终产物的流体力学参数 ( $K_1$ ) 取决于处理时间的长短, 该参数由以下公式计算:

$$K_1 = -0.0021 \times (\text{时间}) + 0.26$$

其中时间的单位为分钟并且不到 1 小时。

参数  $K_1$  直接与产物的相对粘度相关 (成比例)。在产物的水合悬浮液中, 如果以厘泊为单位进行计量时, 相对粘度与实际粘度相等。

本发明提供制备葡聚糖水合浆液的工艺方法, 该水合浆液具有所需的预定粘度。该浆液所含葡聚糖的浓度是所需预定粘度的函数, 所需预定粘度由以下近似公式计算:

$$1/\text{浓度} = K_1 \times (1/\log(\text{相对粘度})) + K_2$$

其中  $K_1 = (\text{形状因子}) \times (\text{流体力学体积})$ ,  $K_2 = (\text{流体力学体积}) / (\text{最大充填率})$ 。

形状因子是经验值, 该经验值表明了在水合环境中的葡聚糖矩阵的形状。形状因子是葡聚糖颗粒长、宽比的函数, 形状因子可通过显微观察的方式加以确定。流体力学体积是葡聚糖颗粒在悬浮液中所占的体积。流体力学体积是葡聚糖悬浮液的一项重要参数, 该参数表明了葡聚糖矩阵的含水能力的高低。最大充填率可以被描述成在单位体积的悬浮液中能够获得的最大葡聚糖体积分率。



### 制备微粒型 $\beta$ -葡聚糖颗粒

通过本领域普通技术人员所知的传统方法可从酵母细胞壁中分离出  $\beta$  (1,3) 葡聚糖的原料。从酵母制备葡聚糖的常用方法包括碱萃取过程以及其后的酸萃取过程 (见 Hassid 等人在《美国化学协会杂志》上发表的文章, 63: 295-298, 1941)。5,223,491 号美国专利对分离高纯  $\beta$  (1,3) 葡聚糖萃取物的改进方法进行了说明, 其中的  $\beta$  (1,3) 葡聚糖不溶于水, 该专利在此通过引证被并入本文。4,992,540 号美国专利对另外一种制备微粒型  $\beta$ -葡聚糖的方法进行了说明, 该专利的全文在此通过引证被并入本文。5,702,719 号美国专利对制备微粒型  $\beta$ -葡聚糖的方法进行了说明, 该专利的全文在此通过引证被并入本文。所制得的葡聚糖微粒的平均颗粒直径约为 1.0 微米或 1.0 微米之下, 或者平均颗粒直径约为 0.2 微米或 0.2 微米之下。

通过机械方式可以降低  $\beta$ -葡聚糖颗粒的直径, 例如可采用捣碎机、微流化器或球磨机来减小  $\beta$ -葡聚糖颗粒的大小。举例而言, 可使用带有钝刀片的捣碎机来降低葡聚糖颗粒的大小, 其中葡聚糖混合物在足够长的时间内被捣碎, 从而在不导致混合物出现过热的情况下将颗粒研磨到所需的大小, 优选的研磨时间为几分钟。另外一种研磨方式是使用 10 毫米不锈钢球磨机对葡聚糖颗粒进行研磨。当希望制备 0.2 微米或更小的葡聚糖颗粒时, 后一种研磨方式特别适用。

在进行研磨之前, 葡聚糖混合物最好经过一系列的筛分, 其中每个筛网的目数都大于前一个筛网的目数, 最后一个筛网的目数约为 80。对葡聚糖混合物进行筛分的目的在于将更大更粗的葡聚糖颗粒与更小的颗粒分离开 (80 目筛网的孔径约为 0.007 英寸或 0.178 毫米)。分离出的较大颗粒然后按前面所述的研磨方法再

进行研磨,并使用最后一个筛网为 80 目的筛分机再次进行筛分。筛分过程和研磨过程可重复进行,直至最终得到的颗粒可穿过 80 目的筛网。筛分出的颗粒被混合到一起,并进行进一步的研磨,优选的研磨时间至少为 1 小时,直至达到所需的颗粒大小,优选的颗粒直径约为 1.0 微米或更小,更理想的颗粒直径约为 0.2 微米或更小。在研磨过程中对葡聚糖颗粒进行定期的采样,并用显微镜上的测微计测定颗粒的大小。

### 激活补体的抗体

能够激活补体的抗体(包括自然存在的抗体和本领域已知方法所制备出的抗体)是作用于肿瘤或肿瘤抗原的抗体,这些抗体可以激活补体群落中的一个或多个补体成员。换句话说就是需要一种能够充分激活补体并使 iC3b 沉积在肿瘤细胞上的抗体。在某些实施方案中,抗体是 I 亚型免疫球蛋白 G 或 II 亚型免疫球蛋白 G。

本发明还对可溶性葡聚糖与抗体的使用进行了说明,其中可溶性葡聚糖基本上可由任何来源产生,抗体包括感染所引发的自然抗体、疫苗所引发的抗体以及直接使用的单克隆抗体;其中单克隆抗体是疗法的一个组成部分,该疗法包括使用  $\beta$ -葡聚糖。任何具有激活补体特性的抗体都可被本文所述的方法用来增强  $\beta$ -葡聚糖的杀灭肿瘤活性。抗体也可以是个体体内自然存在的抗体,这些自然存在的抗体可以充分地使激活补体,从而使 iC3b 沉积在肿瘤细胞上。用本领域已知的技术可对鼠性抗体进行升级,使用其能够抵抗与赘生(肿瘤)细胞相关的抗原。在这一方面,肿瘤细胞表达着数量较多的各种各样的分子受体,这些分子能够提高自身的增长,其中许多分子是致癌基因的产物。因此,人们已制备出了许多单克隆抗体,这些单克隆抗体可以抵抗诸如移动蛋白、白细胞间素-2 以及表皮生长因子这些蛋白的受体。可

以说,任何有选择性地对抗原进行跟踪并能激活补体的抗体在与 $\beta$ -葡聚糖共同使用时都能使自身的活性得到增强。这些抗体包括各种类型的抗体,比如免疫球蛋白 A、免疫球蛋白 D、免疫球蛋白 E 和免疫球蛋白 M,还包括诸如 Fab 这样的抗体片段。

正如本文所用的,“抗体”是指免疫球蛋白分子以及免疫球蛋白分子中具有免疫活性的部分,比如含有抗原结合位点的分子中具有免疫活性的部分,其中的抗原结合位点专门与肿瘤抗原相结合。专门与肿瘤相结合的分子是与肿瘤多肽或肿瘤片段相结合,但基本上不与生物试样中的其他分子相结合,其中生物试样中含有天然多肽类物质。免疫球蛋白分子中具有免疫活性的部分包括 F(ab) 和 F(ab')<sub>2</sub> 片段,使用诸如胃蛋白酶这样的酶对抗体进行处理可产生 F(ab) 和 F(ab')<sub>2</sub> 片段。正如本文所使用的,“单克隆抗体”或“单克隆抗体组合物”是指抗体分子群落,这些抗体分子只含有一种抗原结合位点,该抗原结合位点能够与肿瘤靶目标的某一特定表位发生免疫反应。因此,单克隆抗体组合物通常对本发明中的特定多肽类物质具有单一的结合亲和力,单克隆抗体组合物与特定的多肽类物质发生免疫反应。

按照本文前面所述,通过对适当的个体使用所需的免疫源进行免疫接种可以制备出多克隆抗体,比如使用本发明中的多肽类物质或多肽类物质的片段作为免疫源。抗体在一段时期内在免疫个体中的效价可采用标准技术进行测定,比如使用酶联免疫吸附测定发对抗体的效价进行测定。如果需要,作用于多肽类物质的抗体分子可以从哺乳动物体内分离出来(比如从血液中分离出来)并采用已知的技术进行进一步的提纯,比如使用蛋白 A 色谱仪进行提纯,从而得到免疫球蛋白 G。在实施免疫接种后的适当时间,即抗体效价处于最高时,可从个体获得产生抗体的细胞,

并使用标准技术从这些细胞制备单克隆抗体，其中的标准技术包括杂交瘤技术、人类 B 细胞杂交瘤技术（Kozbor 等人在《当代免疫学》上发表的文章，4: 72）、EB 病毒-杂交瘤技术（Cole 等人所著《单克隆抗体和癌症疗法》（1985），77-96 页）或三源杂交瘤技术。（见 Kohler 和 Milstein 在《自然》上发表的文章，256: 495-497）。产生杂交瘤的技术在本领域是众所周知的技术（见 Coligan 等人编辑的《当代免疫学规程》）。简单而言，无限增殖细胞系（通常是骨髓瘤细胞）与上述接受过免疫接种的哺乳动物的淋巴细胞（通常是脾细胞）相融合，对得到的杂交瘤细胞中的上层培养物进行筛分，从而识别能够产生与本发明中多肽类物质相结合的单克隆抗体的杂交瘤。

为了制备能与本发明中多肽类物质相结合的单克隆抗体，可以使用多种众所周知的方法使淋巴细胞与无限增殖细胞系相融合（见《当代免疫学规程》、Galfre 等人在《自然》上发表的文章，1977,266:55052、R. H. Kenneth 所著的《单克隆抗体：生物分析中的新课题》，Plenum 出版公司，纽约（1980）、Lerner 在《耶鲁生物医药杂志》上发表的文章，54: 387-402）。此外，本领域的普通技术将会理解，对这些方法可以进行各种各样的修改，修改后的方法同样可以使用。

除了制备可分泌单克隆抗体的杂交瘤这种途径外，能与本发明中肽类物质相结合的单克隆抗体可通过使用多肽类物质对重组体组合免疫球蛋白文库（比如抗体噬菌体展示文库）进行筛选被识别和分离出来，通过这一筛选过程可将能与多肽类物质相结合的免疫球蛋白库成员分离出来。通过商业渠道可购得生成和筛选噬菌体展示文库所用的器具（比如药用重组体噬菌体抗体系统，目录号：27-9400-01；Stratagene SurfZAP™ 噬菌体展示器具，目录号：240612）。此外，在以下文献可以找到特别适用于产生

和筛选抗体展示文库所用的方法和试剂：5,223,409号美国专利、WO92/18619号PCT出版物、WO91/17271号PCT出版物、WO92/20791号PCT出版物、WO92/15679号PCT出版物、WO93/01288号PCT出版物、WO92/01047号PCT出版物、WO92/09690号PCT出版物、WO92/02809号PCT出版物、Fuchs等人在《生物技术》上发表的文章，9：1370-1372、Hay等人所著的《人类抗体杂交瘤》，3：81-85、Huse等人在《科学》上发表的文章，246：1275-1281、Griffiths等人在《欧洲分子生物学组织杂志》上发表的文章，12：725-734。

此外，重组体抗体，例如嵌合抗体和人源化单克隆抗体既含有人源部分也含有非人源部分，使用标准的重组体DNA技术可制造出重组体抗体，重组体抗体在本发明的范围之内。使用本领域所知的重组体DNA技术可制备出嵌合抗体和人源化单克隆抗体。

本发明对全葡聚糖颗粒与抗体的使用进行了说明，这些抗体基本上可由任何抗体源产生，其中包括对感染做出响应而自然产生的抗体、对疫苗做出响应而产生的抗体以及直接使用的单克隆抗体和多克隆抗体，单克隆抗体和多克隆抗体是使用 $\beta$ -葡聚糖疗法的一部分。大多数含有人类免疫球蛋白G1Fc区域的人源化单克隆抗体可以激活补体，比如赫塞汀<sup>TM</sup>、美罗华<sup>TM</sup>和Erbitu<sup>TM</sup>这些人源化单克隆抗体可激活补体（见Spiridon C. I.等人在《癌症临床研究》上发表的文章，8：1720-1730（2002），见Idusogie E. E.等人在《免疫学》上发表的文章，164：4178-4184（2000）见Cragg M. S.等人在《血液》上发表的文章，101：1045-1052（2003），见Herbst R. S.和Hong W. K.在《生殖肿瘤学》上发表的文章，29：18-30（2002））。在某些实施方案中，全葡聚糖颗粒和抗体产生协同功效。

为了表明本发明的概念,诸如全葡聚糖颗粒这样的 $\beta$ -葡聚糖可以与 Herceptin<sup>TM</sup> 共同使用,从而达到协同疗效; Herceptin<sup>TM</sup> 是 Genentech 公司出售的一种单克隆抗体,该抗体用来治疗乳房癌。Herceptin<sup>TM</sup> 是一种能够识别 her2 细胞表面抗原的单克隆抗体,在乳房癌细胞类型中有 20%存在 her2 细胞表面抗原。临床试验表明, Herceptin<sup>TM</sup> 可以挽救生命,但同 $\beta$ -葡聚糖共同使用可以显著增强其疗效。在治疗过程中共同使用可溶性葡聚糖和 Herceptin<sup>TM</sup> 可以使对 Herceptin<sup>TM</sup> 疗法有响应的妇女人数显著增加,并使这些妇女的乳房癌得到长期持续的缓解。目前,在接受 Herceptin<sup>TM</sup> 疗法的妇女中只有 15%表现出了长期持续的缓解。

全葡聚糖颗粒可增强其活性的另一种单克隆抗体是美罗华,该单克隆抗体被用来治疗某一类型的非何杰氏淋巴瘤,这是一种免疫系统癌症。美罗华可有效在治疗患有轻度 B 细胞非何杰氏淋巴瘤的患者,这类患者对标准的治疗方法没有反应。B 细胞非何杰氏淋巴瘤的破坏目标是已经发生变换的白细胞(B 细胞),从而导致癌症的生长。美罗华是经过基因改造的鼠源性抗体,该抗体既含有人源性组分又含有鼠源性组分,在对 166 名患有早期轻度或生长缓慢的非何杰氏淋巴瘤患者的临床研究中,接受美罗华治疗的患者中有 48%患者的肿瘤至少减退了一半,另有 6%患者的肿瘤完全消退了。 $\beta$ -葡聚糖被认为可以明显增强这一疗法的疗效, $\beta$ -葡聚糖可以促进抗体标记的肿瘤细胞的灭亡。

### 剂型及使用

可溶性葡聚糖和激活补体的抗体可顺序给药、同时给药或分次给药。此外,给药的次序可以互换,抗体可以是自然存在的抗体。

适用于本发明的口服剂型包括胶囊、凝胶剂、扁胶囊、片剂、泡腾粉剂、泡腾片剂、非泡腾粉剂、非泡腾片剂、粉剂或颗粒剂、水合溶液、水合悬浮液、非水合溶液、非水合悬浮液、水包油乳液或油包水乳液。本发明中的化合物还可以以大丸剂、药糖剂或膏剂形式存在。

一般而言，这些剂型是通过活性成分与液相载体或细微的固相载体或同时与固、液相载体均匀混合后再进行必要的成形加工而制得的。药物载体是根据所选的给药途径和标准制药方法而选定的。每种载体在与制剂中其他成分相兼容的方面上必须是“可接受的”，而且载体绝对不能对个体造成伤害。载体可以是固相载体或液相载体，具体的载体类型一般根据所选用的给药类型而定。具体适用的固相载体包括乳糖、蔗糖、凝胶、琼脂和整装粉剂。具体适用的液相载体包括水、药理上可接受的脂肪和油类物质、醇类物质或其他有机溶剂、其中包括酯类物质、乳液、糖浆或酞剂、悬浮液、溶液和/或悬浮液、由非泡腾颗粒再造的溶液和/或悬浮液以及由泡腾颗粒再造的泡腾制剂。这些液相载体可含有适用的溶剂、防腐剂、乳化剂、悬浮剂、稀释剂、甜味剂、增稠剂和熔剂。优选的载体为食用油，比如玉米或芸苔油。聚乙烯醇也是比较理想的载体。

口服给药所用的剂型可含有无毒的、药理上可接受的惰性载体，比如乳糖、淀粉、蔗糖、葡萄糖、甲基纤维素、硬脂酸镁、磷酸二钙、硫酸钙、甘露醇、山梨醇、环糊精、环糊精衍生物等。

胶囊和片剂易于制造并易于吞咽或咀嚼。片剂可含有适当的载体、粘合剂、润滑剂、稀释剂、崩解剂、着色剂、调味剂、引流或熔剂。片剂可通过压制或模制而制成，可以选择的是，片剂可与一种或多种辅剂制在一起。压制的片剂可通过将自由流体形式（比如粉末、颗粒）的活性成分挤压成形而制得。可以选择

的是，自由流动形式的活性成分可以与粘合剂（比如凝胶、羟丙基甲基纤维素）、润滑剂、惰性稀释剂、防腐剂、崩解剂（比如淀粉羟乙酸钠、交联羧甲基纤维素）、表面活性剂或分散剂混合在一起。适用的粘合剂包括淀粉、凝胶、诸如葡萄糖或 $\beta$ -乳糖这样的天然糖类物质、玉米甜味剂、诸如阿拉伯胶、西黄芪树胶或海藻酸钠这样的天然胶质和合成胶质、羧甲基纤维素、聚乙烯醇、蜡质物质等。可以用于片剂的润滑剂包括油酸钠、硬脂酸钠、硬脂酸镁、苯甲酸钠、醋酸钠、氯化钠等。崩解剂包括淀粉、甲基纤维素、琼脂、膨润土、黄胞胶等。模压成形的片剂可通过在适当的机械中将惰性稀释液湿润的活性成分粉末压模成形而制得。

可以选择的是，片剂还可以加上包衣和标记，并可以制成缓慢释放活性成分的剂型或受控释放活性成分的剂型。此外，还可以在片剂上加上肠溶包衣，从而在胃部以外的消化道中释放药物成分。

药理上可接受的具体载体和制备本发明中口服剂型所用的赋形剂在 3, 903, 297 号美国专利中有所说明，该专利于 1975 年 9 月 2 日被授予 Robert，该专利在此通过引证被并入本文。下列文献对制造本发明药剂所用的技术和材料进行了说明：《7 Modern Pharmaceutics》的第 9、10 章（Banker 和 Rhodes 编辑，1979）、Lieberman 等人所著的《药剂形式：片剂》（1981）以及 Ansel 所著的《药剂形式导论》（第 2 版，1976）。

适合全身给药的剂型包括水合剂型和非水合剂型，这些剂型与给药对象的血液具有相同的张力，适合全身给药的剂型还包括水合无菌悬浮液和非水合无菌悬浮液，这些悬浮液包括的悬浮系统可使悬浮液中的化合物以血液成分为目标或以一个或多个器官为目标。这些制剂可存放在单剂量或多剂量密封容器中，比如



存放于安瓿瓶或玻璃瓶中。从无菌粉末、颗粒以及前面所述的片剂可以制备出现用的注射溶液和悬浮液。全身给药剂型和静脉注射剂还可以包括矿物质和其他物质，从而使这些剂型与注射类型或所选的释药系统相适应。

本文所引述的所有文献在些通过引证被并入本文。现在将通过下面的实例对本发明进行说明，这些实例并不对本发明构成任何限制。

### 实例

CR3 在全葡聚糖颗粒的抗肿瘤活性中发挥着非常重要的作用。通过对 iC3b 调理过的酵母的中性粒细胞吞噬作用机理进行研究，人们已经发现 CR3 的作用在于介导对全葡聚糖颗粒的反应。当 iC3b 附着在某一表面上时，它可以被血清蛋白剪切下来，从而形成更小的 iC3b 片段。当 iC3b 处于“失活”状态时，iC3b 不能形成攻击膜的络合物，但 iC3b 仍然附着在表面上，此时 iC3b 的作用是吸引中粒性细胞和巨噬细胞，这两种细胞可以吞噬可破坏被标记（“调理过的”）细胞。在中性粒细胞和巨噬细胞的表面存在着补体受体（CR3），该补体受体与 iC3b 相结合。图 1 表明了酵母被免疫系统消灭的过程。

刺激 CR3 依赖性吞噬作用或脱粒作用需要 CR3 内两个不同的位点同时发生连接作用；一个位点专门与 iC3b 相连，另一个位点专门与酵母细胞壁的全葡聚糖颗粒相连。正如图 2 所示的，由于酵母在细胞表面上缺乏能与 CR3 相结合的全葡聚糖颗粒，所以经过 iC3b 调理过的酵母菌通过 CR3 与中性粒细胞相结合，但不会刺激吞噬作用或脱粒作用。然而，正如图 3 所示的，所加入的全葡聚糖颗粒可以与 CR3 的凝集素位点相结合，从而激活带有受体的免疫细胞，并由此触发外源性物质的脱粒作用或吞噬

作用。甘露聚糖中富含可溶性的由酵母多聚衍生出的多糖， $\beta$ -葡聚糖与 CR3 具有较高的亲和力， $\beta$ -葡聚糖诱导受体的启动。

图 4 表明的是在 iC3b 调理过的乳房癌细胞触发细胞毒性过程中全葡聚糖颗粒对鼠源性中性粒细胞 CR3 的诱导作用。当使用正常的中性粒细胞时，加入  $\beta$ -葡聚糖会产生针对 iC3b 调理过的乳房肿瘤细胞较高的细胞毒性。然而，当加入 CD11b（鼠源性 CR3 的等效物）的抗体时，受体与 iC3b 相结合的能力受到了干扰，所以这种细胞毒性便消失了。在图 4 右侧表明的是，即使当使用  $\beta$ -葡聚糖进行刺激时，缺乏 CD-11b 小鼠的中性粒细胞也不能介导 iC3b 调理过小鼠的细胞毒性，这再次表明了该受体的重要性。正如所预料的，加入抗 CD11b 抗体对缺乏 CD11b 的中性粒细胞几乎没有影响。

图 5 表明的是肿瘤细胞被免疫球蛋白 G、免疫球蛋白 M 和 C3 所包裹。这一点十分有意义，因为它表明适应性免疫系统对这些肿瘤细胞出现了微弱的反应，并且当这种现象可用来触发细胞毒性反应时，肿瘤的生长可得到抑制或消除。双色流式细胞仪被用来区分乳房肿瘤细胞和正常的乳房表皮细胞，并表明大多数肿瘤细胞带有免疫球蛋白 G、免疫球蛋白 M 和 C3。研究人员对取自两个患者的新鲜肿瘤的单细胞悬浮液进行了分析。图 5 表明的是从一位患者身上取下的肿瘤所得到的结果。通过使用生物素化抗粘蛋白-维生素 H 单克隆抗体 BrE-3 进行染色来区分恶性细胞和正常的乳房表皮细胞。通过使用与异硫氰酸荧光素相连的抗体进行双重染色来确定 MUC1 呈阳性的恶性细胞上存在免疫球蛋白 G、免疫球蛋白 M 和 C3。正如可以看到的，大多数 MUC1 阳性细胞带有免疫球蛋白 G、免疫球蛋白 M 和 C3。只有很少部分 MUC1 阳性细胞没有发生 C3 调理作用。在 MUC1 阴性细胞上

几乎没有出现 C3 或免疫球蛋白染色，这代表着正常乳房表皮细胞。

另一方面，全葡聚糖颗粒与 CR3 相结合，刺激中性细胞的脱粒作用并刺激巨噬细胞分泌几种细胞因子，这些细胞因子会促进 Th1 型 T 细胞反应并促进对肿瘤或微生物的长期免疫力。颗粒型  $\beta$ -葡聚糖还可在体外和体内启动 CR3，从而产生细胞毒性。

天然杀伤细胞是先天免疫系统中的重要组成部分，天然杀伤细胞通过 Fas 配体或通过形成 MAC 络合物并插入诱导脱噬作用的酶来刺激脱噬作用，从而杀死肿瘤细胞。天然杀伤细胞通过瞄准由于肿瘤作用或病毒作用而失去 MHC 蛋白的细胞而恢复巨噬细胞的活性。对于天然细胞的 CR3 依赖型细胞毒性而言，还需要与目标细胞相结合的 CR3。图 6 表明的是对从 12 个患者身上新取下的肿瘤进行试验的结果，通过这些试验确定肿瘤细胞是否带有足够数量的 C3，其中带有可溶性酵母多糖启动过的 CR3 的天然杀伤细胞在识别肿瘤细胞和产生细胞毒性时需要足够数量的 C3。使用铬<sup>51</sup>对新鲜的有活性的肿瘤细胞悬浮液进行示踪，并对该悬浮液受天然杀伤细胞细胞毒性的影响程度进行测试，其中的天然杀伤细胞是从正常的不相关的个体身体上取得的，并在 37℃ 下经过 4 小时的培养。在可溶性酵母多糖中加入  $\beta$ -葡聚糖可有力地加强天然杀伤细胞的活性。虽然在未被激活的天然杀伤细胞中没有发现明显的细胞毒性，但使用 2.0 微克/毫升的可溶性酵母多糖对天然杀伤细胞进行处理可使天然杀伤细胞的细胞毒性从 32% 上升到了 54%。随肿瘤细胞一同被取下的正常乳房表皮细胞的存在可能会阻止细胞毒性达到较高的水平，其中正常的乳房表皮细胞是 C3 阴性细胞。

图 7 表明的是  $\beta$ -葡聚糖疗法的疗效，该图表明了  $\beta$ -葡聚糖疗法对 Balb/c 小鼠的 Ptas64 乳腺癌进行治疗的结果。在该项实验

中 SZPm ( $\beta$ -甘露多糖中富含的可溶性酵母多糖) 被用作  $\beta$ -葡聚糖的来源。Ptas64 乳腺癌被植入到 Balb/c 小鼠体内。在 6 次实验中, 每次实验室用两组小鼠, 每组由 6 只小鼠组成。在每次实验中, 每天通过腹膜内注射或静脉注射方式对两组小鼠使用 200 微克的可溶性酵母多糖 (SZPm)。由 6 只小鼠组成的对照组每天通过静脉注射方式接受磷酸盐缓冲盐水。使用 SZPm 对 30 只小鼠进行三次实验, 然后再使用不含 LPS 的 SZPm 对另外 90 只小鼠进行三次同样的实验。在每次实验后测定治疗组小鼠的平均肿瘤重量, 并与对照组小鼠的平均肿瘤重量进行比较。图 7 中的每根棒图代表的是每个治疗组的平均值  $\pm$  标准偏差。正如可以看到的, 对于腹膜内注射  $\beta$ -葡聚糖和静脉注射  $\beta$ -葡聚糖的情况而言, 肿瘤重量分别急剧减少到了原重量的 4% 和 10%。此外, 在使用不含 LPS 的 SZPm 所进行的实验中, 由于 LPS 的原因没有出现肿瘤消退现象, LPS 是一种众所周知的免疫促进剂。

图 8 表明的是  $\beta$ -葡聚糖疗法既需要肿瘤细胞上带有 C3 同时也需要白细胞带有 CR3。使用植入 MMT 乳腺癌细胞并缺乏 C3 的 129/J 小鼠进行实验可以证实  $\beta$ -葡聚糖疗法需要 C3。在该项实验中, 在 12 只正常 (C3+/+) 的 129/J 小鼠和 12 只缺乏 C3 的 129/J 小鼠体内植入 MMT 乳腺癌细胞系, 在小鼠体内出现了可察觉到的癌肿后对小鼠进行治疗, 每组小鼠由 6 只小鼠组成, 一组小鼠通过每天静脉注射磷酸盐缓冲盐水进行治疗, 另一组小鼠通过每天静脉注射  $\beta$ -葡聚糖进行治疗。使用同样的方法对植入 Ptas64 乳腺肿瘤细胞的正常 (CD+/+) 小鼠和乏 CD3 (没有 CD//b, CD//b-/-) 的 Balb/c 小鼠进行试验。正如图中所示的,  $\beta$ -葡聚糖疗法可使正常 129/J 小鼠体内的肿瘤减少 79%, 这与正常 Blab/c 小鼠的结果是相似的。对肿瘤进行的流式细胞测定表明, 在 80% 以上的肿瘤细胞上沉积有大量的 C3。相比之下, 在缺乏 C3 的 129/J 小鼠中肿瘤没有出现明显的减小, 肿瘤细胞上没有

C3。肿瘤细胞上存在的免疫球蛋白 G 的相对数量在正常小鼠和缺乏 C3 的小鼠间并无差别，通过染色测试可以证实这一点。

下一步是要证明  $\beta$ -葡聚糖可用来增强单克隆疗法的疗效。这些实验的结果在图 9 中表明，该图表明了  $\beta$ -葡聚糖可以增强抗肿瘤的单克隆抗体对肝脏 EL-4 淋巴瘤的疗效。之所以测试 EL-4 淋巴瘤对  $\beta$ -葡聚糖疗法的响应是因为这种肿瘤与其他肿瘤不同，该同系基因型宿主 (C57BL/6) 并不表达天然抗体，其他的天然抗体使用 C3 调理肿瘤细胞。在实验中通过静脉注射方式向小鼠体内注入 EL-4 细胞，这是导致肝脏发生同质蜕变的已知方法。在注入 EL-4 细胞 10 天后，每天通过静脉注射方式对小鼠使用  $\beta$ -葡聚糖、抗 GD2 神经节苷脂 (EL-4 细胞的主要肿瘤抗原) 的 3F8 单克隆抗体或  $\beta$ -葡聚糖加 3F8 单克隆抗体。3F8 单克隆抗体是免疫球蛋白 G3，该抗体是强力的补体激活剂，该抗体还调节抗体依赖性细胞介导的细胞毒性。正如其他实验已经表明的，单独使用 3F8 就可使 EL-4 肝脏肿瘤得到明显的退化 (减小 73.5%)。正如所预料的，由于肿瘤细胞带有很少 iC3b 或没有 iC3b，所以单独使用  $\beta$ -葡聚糖几乎没有效果。然而，同单独使用 3F8 相比，联合使用  $\beta$ -葡聚糖和 3F8 可使肝脏肿瘤出现更显著的消退。

图 10 表明的是大麦产生的  $\beta$ -葡聚糖 (大麦通常产生 (1, 3), (1, 4) -  $\beta$ -D-葡聚糖) 也可以增强单克隆抗体的抗肿瘤活性。通过皮下异种嫁接方式在无胸腺 Balb/c 小鼠体内植入成神经细胞肿瘤细胞。每 5 只小鼠组成一组，在植入肿瘤细胞 2 周后当肿瘤的直径达到 0.7~0.8 厘米时开始进行治疗。在使用  $\beta$ -葡聚糖进行治疗的小组中，每天口服 400 微克的  $\beta$ -葡聚糖，治疗期为 21~29 天。单克隆抗体 (3F8) 通过静脉注射方式给药，用药量为每周 2 次，每次 200 微克。从治疗的第一天开始测量肿瘤的大小。所测

得的最大直径被表达为第零天肿瘤直径的百分数。正如可以看到的,无论是单独使用 $\beta$ -葡聚糖还是单独使用单克隆抗体都没有取得较大的效果。然而,当 $\beta$ -葡聚糖和单克隆抗体联合使用时,肿瘤的生长得到了明显的抑制。

表 1. 蔗糖和中性粒细胞被异硫氰酸荧光素示踪多糖荧光染色的  
CR3 特性

异硫氰酸荧光素示踪的多糖类型	最大特异性荧光染色(受体的结合位点达到饱和状态)所需的多糖-异硫氰酸荧光素浓度	在饱和状态下(在有过量未示踪多糖存在下所得到的总-非特异性荧光性)特异性荧光性平均通道	特异性荧光性抑制% 由 SZP 导致的抑制(50 微克/毫升)	由 MN-41 抗 CR3 导致的抑制(50 微克/毫升)
右旋糖酐-异硫氰酸荧光素	没有特异性染色	0	未测到	未测到
$\alpha$ -甘露多糖-异硫氰酸荧光素	没有特异性染色	0	未测到	未测到
大麦 $\beta$ -葡聚糖-异硫氰酸荧光素	10	12.8	92.3	94.5
CM $\beta$ -葡聚糖-异硫氰酸荧光素	5	22.2	87.8	78.9
昆布多糖-异硫氰酸荧光素	10	38.2	91.5	89.9
蘑菇多糖-异硫氰酸荧光素	5	21.5	96.3	81.0
MP $\beta$ -葡聚糖-异硫氰酸荧光素	2	50.9	100	96.1
SZP-异硫氰酸荧光素	2	175	99.8	77.4

表 1 所表明的是各种来源的 $\beta$ -葡聚糖的蔗糖特异性,同时还表明了流式细胞测定仪对各种纯 $\beta$ -葡聚糖-异硫氰酸荧光素制剂

的测定结果。右旋糖酐-异硫氰酸荧光素和 $\alpha$ -甘露多糖-异硫氰酸荧光素没有出现特异性染色。即使每种多糖-异硫氰酸荧光素制剂所产生的中性粒细胞染色强度比 SZP-异硫氰酸荧光素的染色强度低, 每种多糖-异硫氰酸荧光素的荧光性也同样受到过量未踪同源 $\beta$ -葡聚糖、未示踪的 SZP 或抗 CR3 的抑制。对达到最大染色程度所需的多糖浓度进行的比较表明, 由于 SZP 或 MP $\beta$ -葡聚糖(从分子探针得到的可溶性 $\beta$ -葡聚糖)中任何一个达到饱和状态需要浓度为 2 微克/毫升的己糖, 所以 SZP 和 MP $\beta$ -葡聚糖具有最强的亲和力。由于异硫氰酸荧光素与多糖的摩尔比有可能发生变化, 并且不容易通过计算得到, 所以单独多糖-异硫氰酸荧光素所产生的荧光强度值无法进行比较。

对 SZP-异硫氰酸荧光素染色程度抑制 50%所需 $\beta$ -葡聚糖浓度进行比较可以得出: CR3 对 SZP 的亲和力比 $\beta$ -葡聚糖对 SZP 的亲和力高。中性粒细胞在 4℃和不同浓度的 $\beta$ -葡聚糖(SZP、昆布多糖、MP $\beta$ -葡聚糖、大麦 $\beta$ -葡聚糖和蘑菇多糖)、 $\alpha$ -甘露多糖或右旋糖酐条件下培养 15 分钟, 然后加入 1.0 毫克/毫升的 SZP-异硫氰酸荧光素进行染色, 然后再在 4℃下培养 15 分钟。然后对抑制百分数和多糖浓度进行比较。虽然将 SZP-异硫氰酸荧光素染色程度抑制 50%需要 0.2 微克/毫升的己糖, 但未示踪的 $\beta$ -葡聚糖要将 SZP-异硫氰酸荧光素染色程度抑制 50%需要 5 毫克/毫升的己糖(MP $\beta$ -葡聚糖或昆布多糖)到 75 微克/毫升的己糖(蘑菇多糖)。当对相同的未示踪多糖抑制昆布多糖 $\beta$ -葡聚糖-异硫氰酸荧光素染色进行测试时可以得到相似的结果。在两个试验中抑制活性的排位的是: SZP>昆布多糖>MP $\beta$ -葡聚糖。然而, CM $\beta$ -葡聚糖(从酵母得到的羧甲基 $\beta$ -葡聚糖)、大麦 $\beta$ -葡聚糖和蘑菇多糖抑制昆布多糖-异硫氰酸荧光素染色的效率高于其抑制 SZP-异硫氰酸荧光素染色的效率。总之, 这些结果表明大麦 $\beta$

-葡聚糖对 CR3 的亲合力相对低于可溶性酵母  $\beta$ -葡聚糖或 SZP 对 CR3 的亲合力。

正如表 1 所示的, 大麦  $\beta$ -葡聚糖对 CR3 的亲合力低于酵母  $\beta$ -葡聚糖对 CR3 的亲合力。图 11 表明了酵母  $\beta$ -葡聚糖和大麦  $\beta$ -葡聚糖在单独使用时和与抗 GD2 神经节苷脂单克隆抗体联合使用时这两种  $\beta$ -葡聚糖抗肿瘤效果的比较结果, 其中 GD2 神经节苷脂是 RMA-S 淋巴瘤表达的肿瘤抗原。可溶性葡聚糖的用药剂量为 10 毫克/公斤, 大麦  $\beta$ -葡聚糖的用药剂量为 60 毫克/公斤。结果表明, 单独使用可溶性葡聚糖比单独使用大麦  $\beta$ -葡聚糖更有效。可溶性葡聚糖的单位重量效率明显更高。当与单克隆抗体联合使用时, 可溶性葡聚糖还能更快地抑制肿瘤, 可溶性葡聚糖比大麦  $\beta$ -葡聚糖早 5 天使肿瘤的直径减小到 2 毫米。对使用抗 GD2 单克隆抗体和可溶性葡聚糖  $\beta$ -葡聚糖进行治疗的小鼠进行目测观察还可发现在接受 B5 非特异性单克隆抗体治疗的对比小鼠间存在着较大的差别。虽然对比小鼠长出了大的致死性肿瘤, 但使用可溶性葡聚糖和单克隆抗体治疗的小鼠只有很小的肿瘤, 或者未出现肿瘤, 其中 50% 的小鼠可以长期存活。综合来看, 这些结果表明可溶性葡聚糖比大麦  $\beta$ -葡聚糖具有明显的优势。

本发明对颗粒型  $\beta$ -葡聚糖与抗体的使用进行了说明, 其中可溶性葡聚糖基本上可由任何来源产生, 抗体包括感染所引发的自然抗体、疫苗所引发的抗体以及直接使用的单克隆抗体; 其中单克隆抗体是疗法的一个组成部分, 该疗法包括使用  $\beta$ -葡聚糖。

在某些实施方案中, 需要一种能够充分激活补体从而使 iC3b 沉积在肿瘤细胞上的抗体。在大多数情况下, 对抗体介导补体直接杀灭肿瘤细胞的能力进行评估。除美罗华外, 大多数治疗性抗体激活补体, 但补体没有能力杀灭肿瘤细胞。这一点与葡聚糖疗法无关。并不需要补体来杀灭肿瘤细胞, 所需要的是表面上结合



有 iC3b 的补体, 这些补体以肿瘤细胞为靶细胞。iC3b 沉积在肿瘤细胞上所需要的激活补体大大少于补体杀灭肿瘤细胞所需要的激活补体。因此, 肿瘤细胞上补体抑制剂的存在会充分阻止补体激活, 从而阻止补体直接杀灭肿瘤细胞, 但激活的补体足以用 iC3b 来标记肿瘤细胞。

图 12 表明的是在口服全铺聚糖颗粒和单克隆抗体联合疗法中杀灭肿瘤细胞的活性与白细胞三烯 B4 受体吸收白细胞之间的关系。图 12 表明, 除天然杀伤细胞外, 抗肿瘤反应中还涉及单核细胞和中性粒细胞。白细胞三烯 B4 是一种化学引诱物, 它主要由中性粒细胞和巨噬细胞产生。白细胞三烯 B4 涉及到多个过程, 其中包括: 促进白细胞向血液外的迁移、激活中性粒细胞、引发炎症疼痛、提高宿主对感染的抵抗力、增加白细胞间素的生成和转录。由于白细胞三烯 B4 的存在对于  $\beta$ -葡聚糖的抗肿瘤活性十分重要, 所以很明显, 除天然杀伤细胞外, 巨噬细胞和中性粒细胞也参与了免疫反应。

天然杀伤细胞在调节宿主抵抗力方面的作用包括直接杀灭肿瘤细胞和分泌诸如肿瘤坏死因子- $\alpha$ 和干扰素- $\gamma$ 这样的细胞因子, 这些细胞因子可以潜在地调节免疫反应以及补充杀灭肿瘤的巨噬细胞。虽然通过激活 CR3 可以调节天然杀伤细胞对肿瘤的直接杀灭毒性, 但其他的研究表明激活 CR3 也可触发细胞因子的分泌。为证实这一点, 研究人员进行了相关实验, 图 13 表明了实验结果。图 13 表明了  $\beta$ -葡聚糖对天然杀伤细胞分泌肿瘤细胞坏死因子- $\alpha$ 的 CR3 依赖性刺激。人类天然杀伤细胞或者使用颗粒状酵母  $\beta$ -葡聚糖或使用可溶性 CR3 结合多糖在 37°C 下培养 18 小时。然后使用联免疫吸附测定法对培养上清液进行了分析。颗粒状酵母  $\beta$ -葡聚糖 (2 微克/毫升) 和灰树花多糖 (由多叶奇果菌产生的 500Kda 可溶性  $\beta$ -葡聚糖, 2 微克/毫升) 能够与表面

CR3 分子上的凝集素位点相结合和形成交联,从而激活细胞分泌肿瘤坏死因子- $\alpha$ 和白细胞间素-6(未在图中表明)。相比之下,小的(20KDa)可溶性酵母 $\beta$ -葡聚糖(MP $\beta$ -葡聚糖,2.0 微克/毫升)和SZP(含有 $\beta$ -低甘露聚糖和/或 $\beta$ -葡聚糖的可溶性酵母多糖制剂,2.0 微克/毫升)只与单个的CR3分子相结合,在缺乏靶细胞的情况下不会促进细胞的因子的释放。与天然杀伤细胞CR3依赖型细胞毒性一样,小 $\beta$ -葡聚糖与CR3的结合可导致受体的启动,受体的启动是此后释放细胞因子所需的条件,与iC3b调理过的靶细胞(使用iC3b-“+EC3b”调理过的羊体红细胞)形成配位连接可触发细胞因子的释放。EC3bi靶细胞在缺乏多糖启动作用的情况下不会触发天然杀伤细胞释放细胞因子。在多糖启动CR3之后,与iC3b靶细胞形成配位连接可诱导天然杀伤细胞分泌肿瘤坏死因子- $\alpha$ 、干扰素- $\gamma$ 、干扰素- $\alpha$ 和白细胞间素-6。加入浓度为5毫克/毫升的抗CD11b单克隆抗体可阻止天然杀伤细胞分泌这四种细胞因子。抗CR3可阻止 $\beta$ -葡聚糖与CR3的结合,并可阻止经过启动的CR3与EC3bi靶细胞上的iC3b结合。

图13表明了这些结果,天然细胞分泌细胞因子与CR3被激活而产生细胞毒性是同步发生的。颗粒型 $\beta$ -葡聚糖可强力触发CR3依赖型中性细胞过氧化物的爆发,颗粒型 $\beta$ -葡聚糖同样会触发天然杀伤细胞释放出CR3依赖型细胞因子。细胞因子的分泌不是与CR3的初始启动过程同时发生的,CR3的初始启动过程是与小型可溶性 $\beta$ -葡聚糖与CR3结合的过程同时进行的,在经过 $\beta$ -葡聚糖启动的CR3与iC3b调理过的靶细胞形成交联连接所触发的CR3激活步骤后,天然杀伤细胞才分泌细胞因子。使用EC3bi在介质中单独培养天然杀伤细胞并不会刺激天然杀伤细胞溶解EC3bi,也不会触发天然杀伤细胞分泌细胞因子。然而,在使用可溶性(或颗粒型) $\beta$ -葡聚糖启动天然杀伤细胞的CR3后加入EC3bi,使用联免疫吸附测定法可检测到分泌出的肿瘤坏

死因子- $\alpha$ 、干扰素- $\alpha$ 、干扰素- $\gamma$ 和白细胞间素-6。分泌这些细胞因子依赖于 CR3, 因为当同时加入靶目标 EC3bi 和 CD121b 单克隆抗体时, 细胞因子的分泌会遭到抑制。

这一数据进一步说明了  $\beta$ -葡聚糖在癌症免疫疗法中的成功应用。除了当经过  $\beta$ -葡聚糖启动过的天然杀伤细胞进入到 iC3b 调理过的肿瘤细胞中时可触发细胞毒性外, 这种由 iC3b 调理过的肿瘤细胞所刺激产生的局部细胞毒性还伴随细胞因子的分泌, 但细胞因子的分泌是局部的, 并不是全身性的。

## 实例 2

### 材料和方法

#### 抗体和其他试剂

Hiroshi Fugi 博士(纽约州水牛城 Roswell Park 癌症研究院分子免疫学分部)慷慨地提供了产生杂交瘤的抗小鼠乳房肿瘤病毒 11C1 免疫球蛋白 G2a (见 Raychaudhuri S.等人在《免疫学》杂志上发表的文章, 137: 1743-1749 (1986))。Nai-Kong V. Cheung 博士(纽约 Sloan-Dettering 癌症中心)慷慨提供了 3F8 免疫球蛋白 G3 抗 GD 神经节苷脂单克隆抗体(见 Saito M.、Yu R. K 和 Cheung N-K. V.在《生物化学生物物理研究通讯》上发表的文章), 该单克隆抗体经过提纯处理并存在于无菌的柠檬酸盐缓冲盐水中。Ralph A. Reisfeld 博士(加州 Scripps 临床研究院)慷慨提供了高纯 14.G2a 免疫球蛋白 G2a 抗 GD2 单克隆抗体(见 Hank J. A. 等人在《癌症研究》上发表的文章, 50: 5234-5239, 1990, 见 Uttenreuthetr-Fischer M.和 M. Huang 等人在《癌症免疫疗法》上发表的文章, 41: 29-36, 1995)以及杂交瘤。Ian F. C. McKenzie (澳大利亚 Austin 研究院)提供了产生免疫球蛋白 G2b 抗人类

MUC1 单克隆抗体的 BCP8 杂交瘤 (见 Xing P. X. 等人在《癌症研究》上发表的文章, 52: 2310-2317 (1992))。Emil Umanue 博士 (华盛顿大学医学院) 提供了产生鼠源性抗鼠类粒性白细胞单克隆抗体 RB6-8C5 (LY-6G-抗 GR-1) (见 Hestdal K. 等人在《免疫学》上发表的文章, 147: 22-28, (1991))。分泌鼠源性免疫球蛋白 G2a 单克隆抗体的 B5 杂交瘤从美国标准菌库中获得。其中鼠源性免疫球蛋白 G2a 单克隆抗体对人类的高分子量黑色素瘤抗原具有特异性。分离出的免疫球蛋白 G 在小鼠肿瘤疗法中被用作“非特异性”单克隆抗体对照物。每种杂交瘤在 1~2% 的 FCS 和 BD 杂交瘤介质中生长, 然后在生物反应器中生长, 从而生成富含单克隆抗体的培养后介质, 随后按硫酸铵沉淀、单-Q 快速蛋白液相色谱法和单-S 快速蛋白液相色谱法这一顺序对单克隆抗体进行提纯。提纯后的单克隆抗体通过超滤过程进行消毒, 并使用 Triton X-114 (见 Aida Y. 和 Pabst M. J. 等人在《免疫方法》上发表的文章, 132: 191-195 (1990)) 进行萃取而去除可察觉到的 LPS。

羊源性抗鼠体抗体免疫球蛋白 M、免疫球蛋白 G 和异硫氰酸荧光素示踪的 C3 从 ICN Biomedicals/Cappell 购买, 这些物质被用于使用流式细胞测定仪对免疫球蛋白和经过 C3 调理过的肿瘤细胞悬浮液的分析。抗鼠体 CD45-PerCP-Cy5.5、抗鼠体 CD80-异硫氰酸荧光素、抗 Gr-1-PE、抗鼠体 CD11-异硫氰酸荧光素以及正确示踪的同类型对照物从 BD Biosciences Pharmingen 购买。鼠源性抗鼠体 F4/80-异硫氰酸荧光素及其同类型对照物从 Calmag 实验室获得。

#### 治疗所用的 $\beta$ -葡聚糖

全葡聚糖颗粒制剂是从明尼苏达州的生物聚合物工程公司获得的。大麦葡聚糖可从任何的商业渠道获得, 比如从 Sigma 化

学公司获得, 使用本领域已知的方法加工和制备可溶性葡聚糖, 比如使用 Xia Y.等人在《免疫学》上所发表文章 (162: 2281-2290 (1999))以及 Thornton B. P.等人在《免疫学》上所发表文章 (156: 1235-1246 (1996)) 所述的方法加工和制备可溶性葡聚糖。

### 小鼠和肿瘤模型

正常的 Balb/c 和 C57B1/6 小鼠购自于 Jackson 实验室或 NCI-Frederick 公司。缺乏 C3 的杂种小鼠 ( $C3^{+/-}$ ) 购自于 Jackson 实验室, 这些小鼠被用来建立繁殖种群, 从该种群中衍生出缺乏 C3 的纯种小鼠 ( $C3^{-/-}$ ) 以及它们的野生型 ( $C3^{+/+}$ ) C57B1/6 同胞。缺乏 CR3 ( $CD11b^{-/-}$ ) 的 C57B1/6 小鼠 (见 Coxon A.和 Rieu 等人在《免疫》上发表的文章, 5: 553-666, (1996) 及其野生型 ( $CD11b^{+/+}$ ) C57B1/6 同胞仔的繁殖种群是从 Tanya Mayadas-Norton 博士 (波士顿 Brigham 妇女医院和 Harnard 医学院) 获得的。通过分别使用定量半径免疫扩散法对血清 C3 进行分析以及使用免疫荧光染色法和流式细胞测定仪对血液中性粒细胞 CD11b 的表达进行分析来证实  $C3^{-/-}$  和  $CR3^{-/-}$  的表型及其同胞小鼠。

Blab/c 乳腺癌被称为 Ptas64(或 64PT), 这种癌细胞是从 Wei-Zen Wei 博士 (底特律 Karmonos 癌症中心和 Wayne 州立大学) 获得的。该肿瘤细胞系表达小鼠乳房肿瘤病毒 (鼠源性乳腺肿瘤病毒) 膜抗原, 使用 11C1 单克隆抗体可检测到这种膜抗原。以前的研究表明, 正常 Blab/C 小鼠血清中含有自然存在的抗体, 这些抗体能与 Ptas64 发生反应, 这些抗体通过免疫球蛋白 M、免疫球蛋白 G 和 C3 来调理肿瘤细胞在体内的生长; 以前的研究还表明, 静脉注射 11C1 单克隆抗体可提高细胞表面对免疫球蛋白 G 和 C3 的吸收量 (见 Yan J.等人在《免疫学》上发表的文章, 163: 3045-3052 (1990))。在四组小鼠的乳腺脂肪垫内, 通过皮

下注射方式植入  $1.0 \times 10^6$  个肿瘤细胞,并使肿瘤细胞在小鼠体内生长 7~10 天。当使用测径器测得肿瘤的平均长度和宽度达到 3~4 毫米时开始对小鼠进行治疗。每隔 2 天对肿瘤的大小进行一次测量,当肿瘤直径达到 15 毫米时杀死小鼠。

高度表达膜 GD2 神经节苷脂的 C57B1/6 淋巴瘤 EL-4 由 Nai-Kong V. Cheung 博士提供。通过静脉注射方式向正常的 C57B1/6 小鼠体内植入  $3 \times 10^5$  个 EL-4 细胞,从而使小鼠长出肝脏肿瘤(见 Zhang H.等人在《癌症研究》上发表的文章, 58: 2844-2849 (1998))。在治疗 2 星期后,取出接受治疗小鼠的肝脏并对其进行称重,然后与正常的未患肿瘤的小鼠肝脏进行比较。用患有肿瘤小鼠的肝脏重量减去正常小鼠的肝脏重量(1.0 克)可以得出肝脏肿瘤的净重量。使用 C57B1/6 淋巴瘤 RMA-S 进行类似的肝脏肿瘤模型实验,淋巴瘤 RMA-S 同样表达 GD2 神经节苷脂,但在 I 型 MHC(由匹斯堡癌症研究院的 Olivera J. Finn 博士提供)联合抗 GD2 神经节苷脂(100 微克,每隔 2 天静脉注射一次)的 14.G2a 单克隆抗体的肽加载方面存在着缺陷。治疗持续 3 个星期,然后对小鼠的存活期进行长期观察。

转染了人类 MUC1 的 RMA-S 肿瘤细胞也由 Finn 博士提供,通过皮下植入方式在 C57B1/6 小鼠的乳房脂肪垫内或脂肪垫附近植入  $1 \times 10^6$  个 RMA-S 肿瘤细胞。在植入肿瘤细胞后 8-10 天,小鼠的体内出现了 3~4 毫米的肿瘤,此时使用 14.2a 抗 GD2 神经节苷脂的单克隆抗体或 BCP8 抗 MUC1 单克隆抗体在联合使用  $\beta$ -葡聚糖或不联合使用  $\beta$ -葡聚糖的情况下进行治疗,治疗持续 2 星期或 3 星期,然后按前面所述的过程测量肿瘤,当肿瘤直径达到 15 毫米时杀死小鼠。对没有肿瘤的小鼠进行为期 90~120 天的生存期观察。

由 C57B1/6 小鼠衍生出来的路易氏肺癌细胞 (LL/2、CRL-1642) 是从美国标准菌库中获得的。使该肺癌细胞转染含有人类 MUC1 CDNA 的质粒, 该质粒由 Olivera Finn 博士提供。LL/2 细胞系均匀表达高表面强度的 MUC1, 通过对 BCP8-异硫氰酸荧光素单克隆抗体染色的细胞进行荧光激活细胞分类而对 LL/2 细胞系进行选择。通过使该细胞系两次通过皮下方式经过 C57B1/6 小鼠而对该细胞系进行进一步的选择。被选用的肿瘤细胞系既在表面上高度表达 MUC1, 同时又能够在植入  $5 \times 10^5$  个肿瘤细胞的情况下在 C57B1/6 小鼠的皮下产生肿瘤。在植入肿瘤细胞 7 天后, 当肿瘤直径达到 1~2 毫米时开始对患皮下肿瘤的小鼠进行治疗。治疗过程持续 3 个星期, 其中每隔 2 天对肿瘤直径进行一次测量, 当肿瘤直径达到 15 毫米时杀死小鼠。对没有肿瘤的小鼠做为期 90 天的长期生存观察。

根据数据进行绘图以及数据的统计分析

肿瘤治疗的全部数据被输入 Prism3.0 (加州圣迭哥图板软件公司的软件), 从而生成肿瘤退化或小鼠存活的图形。然后在 Prism3.0 进行 t 检验, 从而确定不同数据组的重要性。

## 结果

口服酵母全  $\beta$ -葡聚糖颗粒所导致的肿瘤退化和存活情况改善与静脉注射酵母  $\beta$ -葡聚糖的情况相似。正如在以上“材料和方法”一节中所述的, 在 Balb/c 小鼠体内植入 Ptas64 肿瘤细胞, 植入 7 天后有肿瘤形成, 此时通过单独静脉注射抗小鼠乳房肿瘤病毒单克隆抗体进行治疗, 或在同时静脉注射可溶性酵母  $\beta$ -葡聚糖或口服全葡聚糖颗粒的条件下进行治疗。优选的全葡聚糖口服剂量约在 200~400 微克/天。图 14 表明了平均值  $\pm$  标准偏差。

口服可溶性大麦 $\beta$ -葡聚糖或酵母 $\beta$ -葡聚糖颗粒所导致的肿瘤退化需要白细胞的 CR3。正如在以上“材料和方法”一节中所述的，在野生型或缺乏 CR3 的 C57B1/6 小鼠的皮下植入 RMA-S-MUC1 肿瘤细胞，植入 10 天后有肿瘤形成，此时通过单独静脉注射抗 GD2 神经节苷脂的 14.G2a 单克隆抗体进行治疗，或在同时口服酵母 $\beta$ -葡聚糖或口服大麦 $\beta$ -葡聚糖的条件下进行治疗。在口服 $\beta$ -葡聚糖的当天（共 10 天），对某些小鼠组静脉注射单克隆抗体，而其他小鼠组在静脉注射单克隆抗体前 3 天口服 $\beta$ -葡聚糖。图 15 表明了平均值 $\pm$ 标准偏差。

可溶性大麦葡聚糖或颗粒型酵母 $\beta$ -葡聚糖疗法要达到长期无肿瘤存活的效果需要白细胞的 CR3。图 16 表明了结果。这是图 15 所示试验的存活情况分析。

口服可溶性大麦 $\beta$ -葡聚糖或酵母 $\beta$ -葡聚糖颗粒所导致的肿瘤退化需要血清的 C3。正如在以上“材料和方法”一节中所述的，在野生型或缺乏 CR3 的 C57B1/6 小鼠的皮下植入 LL/2-MUC1 肿瘤细胞，植入 7 天后有肿瘤形成，此时通过单独静脉注射抗 MUC1 的 BCP8 单克隆抗体进行治疗，或在同时口服酵母 $\beta$ -葡聚糖或口服大麦 $\beta$ -葡聚糖的条件下进行治疗。图 17 表明了平均值 $\pm$ 标准偏差。口服可溶性大麦葡聚糖或颗粒型酵母 $\beta$ -葡聚糖疗法要达到长期无肿瘤存活的效果需要血清的 C3。图 18 表明了结果。这是图 17 所示试验的存活情况分析。

口服的荧光素示踪颗粒型酵母 $\beta$ -葡聚糖被巨噬细胞所吸收，这些巨噬细胞将迁移到脾、淋巴结和骨髓中。正如在以上“材料和方法”一节中所述的，使野生型或缺乏 CR3 的 C57B1/6 小鼠每天口服全葡聚糖颗粒-荧光素，然后对小鼠进行解剖，从而通过荧光显微镜分析含有全葡聚糖颗粒-荧光素的细胞在淋巴组织中的分布情况。结果表明的是口服全葡聚糖颗粒-荧光素 3 天后



野生型小鼠的脾巨噬细胞。野生型或缺乏 CR3 小鼠的结果表明的是, 在连续 7 天口服全葡聚糖颗粒-荧光素后通过吸收和洗涤从纤维结合素覆盖的试验盘中分离出来的骨髓巨噬细胞。野生型小鼠和缺乏 CR3 小鼠的骨髓细胞在含有全葡聚糖颗粒-荧光素的细胞比例或细胞大小和每个细胞所含全葡聚糖颗粒-荧光素的数量方面没有明显的差别。使用 F4/80-Cy5 对骨髓细胞进行的双重染色证实, 所有含有已降解全葡聚糖颗粒-荧光素的细胞都是巨噬细胞。在口服全葡聚糖颗粒-荧光素 7~12 天后, 在野生型小鼠体内观察到了骨髓粒性白细胞, 野生型小鼠出现了膜表面荧光染色; 但缺乏 CR3 的小鼠没有出现骨髓粒性白细胞。

有空白边缘的粒性白细胞库吸收可溶性  $\beta$  葡聚糖需要膜表面 CR3。正如在以上“材料和方法”一节中所述的, 10 只野生型小鼠和 10 只缺乏 CR3 的 C57B1/6 小鼠每天口服全葡聚糖颗粒-荧光素, 服用期为 12 天, 然后使用巯基乙酸盐对腹膜粒性白细胞进行诱导, 并使用流式细胞测定仪进行表面荧光染色分析。在这一分析中, 使用抗 Gr-1-Cy5 双重染色法来鉴别力性白细胞。图 19 表明了分析结果。

在另一实验中, 野生型小鼠和缺乏 CR3 的 C57B1/6 小鼠每天口服全葡聚糖颗粒, 服用期为 7 天。使用巯基乙酸盐对野生型小鼠和缺乏 CR3 的 C57B1/6 小鼠的腹膜粒性白细胞进行隔夜诱导, 并对这些粒性白细胞在调节杀灭 iC3b 调理过的 Ptas64 乳腺肿瘤细胞的能力进行测试, 其中经 iC3b 调理过的 Ptas64 乳腺肿瘤细胞由铬<sup>51</sup>进行示踪。没有口服全葡聚糖颗粒的小鼠作为对比组。结果表明, 巯基乙酸盐从口服全葡聚糖颗粒的野生型小鼠诱导的粒性白细胞能够在体外调节对 iC3b 调理过的 Ptas64 乳腺肿瘤细胞的细胞毒性, 但巯基乙酸盐从缺乏 CR3 的 C57B1/6 小鼠诱导的粒性白细胞没有这种调节能力。通过测定释放出的铬<sup>51</sup>数量来

测试口服全葡聚糖颗粒 12 天后野生型小鼠和缺乏 CR3 小鼠的粒性白细胞对杀灭 iC3b 调理过的 Ptas64 乳腺肿瘤细胞的细胞毒性进行调节的能力。

本领域技术人员将认识到或有能力理解，在只不过是常规实验技术的情况下，就可以取得与本文所说明的具体实施方案相同的结果。这些等同的结果被认为是在以下权利要求范围之内。

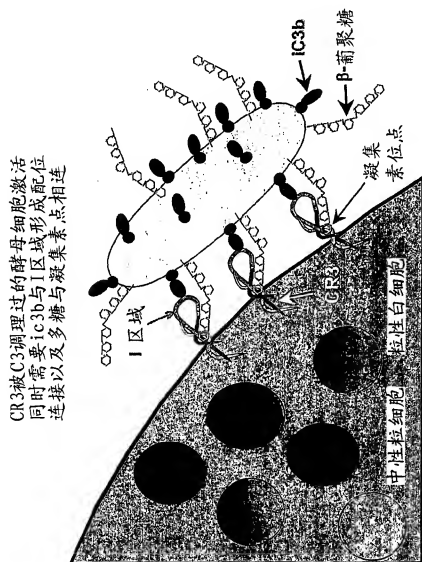


图 1

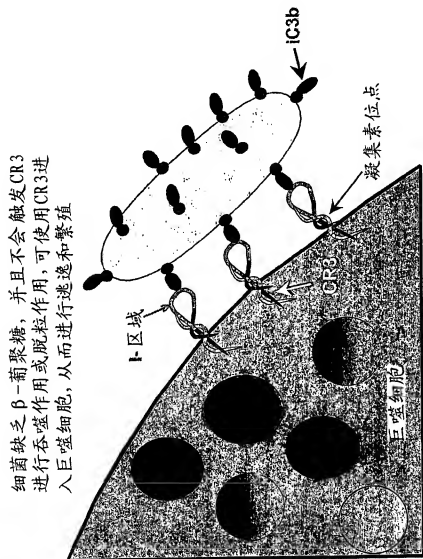


图 2

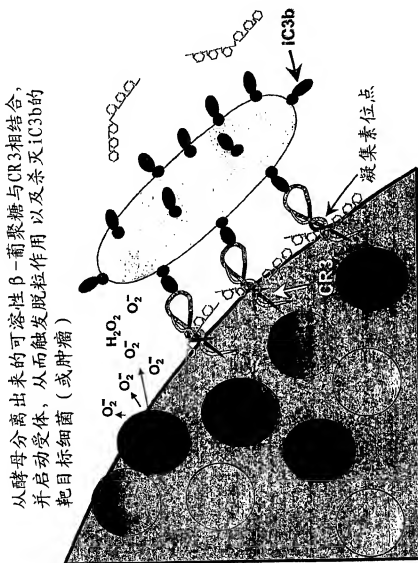


图 3

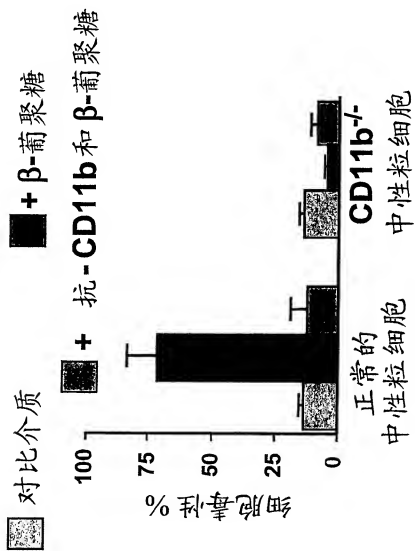
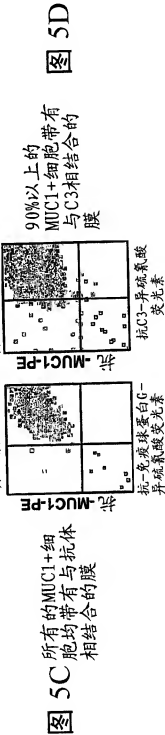
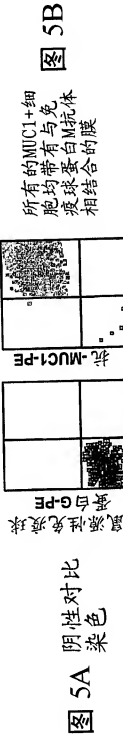


图4

使用双色流式细胞测定仪对取自患乳腺癌小鼠  
的肿瘤细胞进行免疫球蛋白M、免疫球蛋白G或  
C3分析



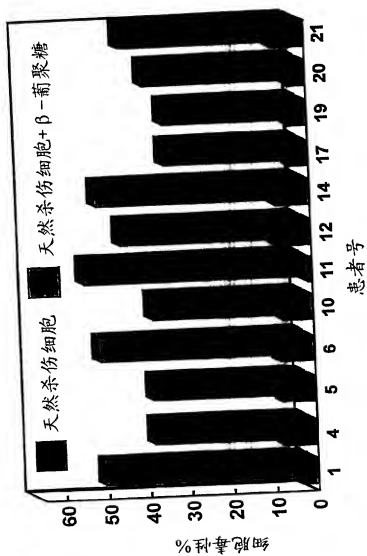
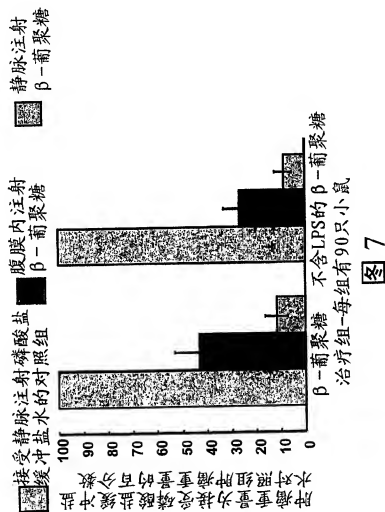


图 6





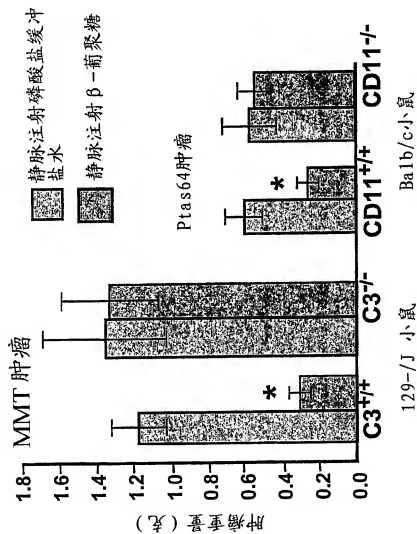
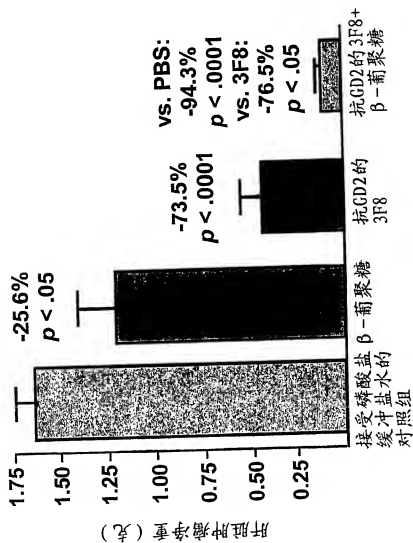


图 8



治疗组 (每组有6只小鼠)

图 9

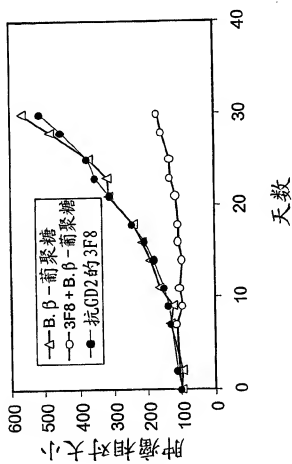
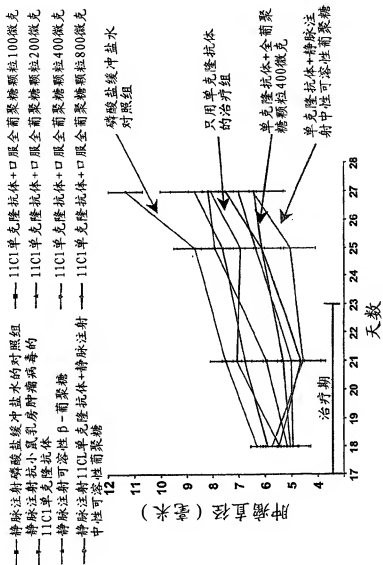


图10



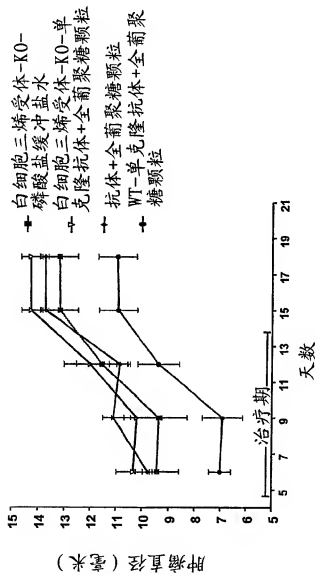


图12

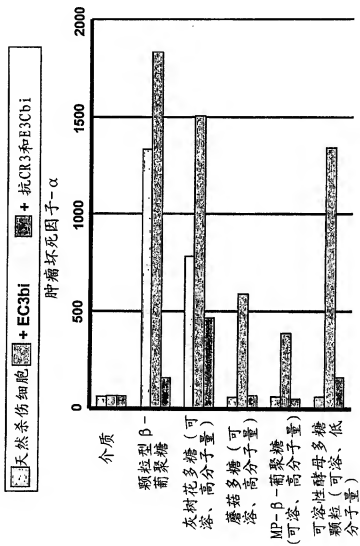


图13

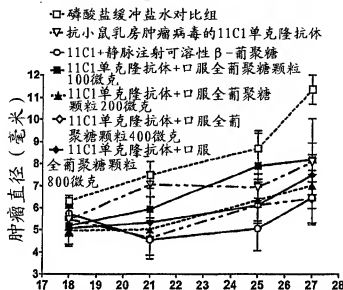


图 14A

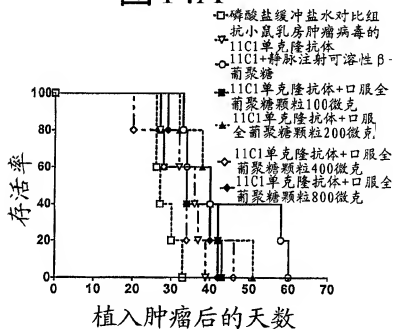


图 14B



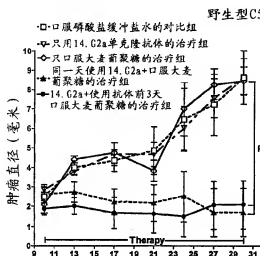


图 15A

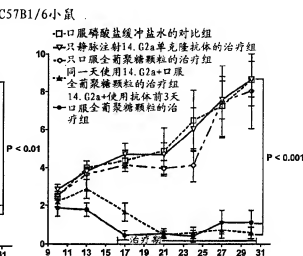


图 15B

缺乏CR3的C57Bl/6小鼠

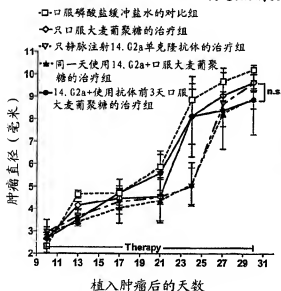


图 15C

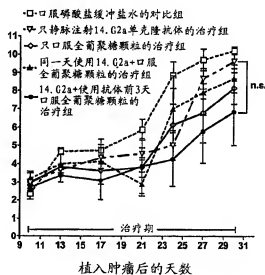


图 15D

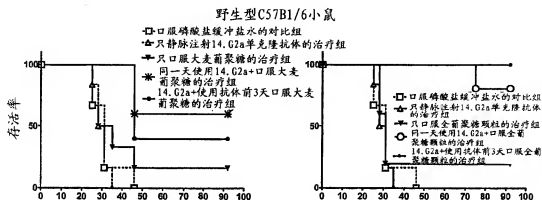


图16A

图16B

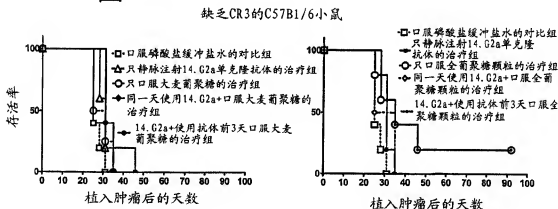


图16C

图16D

野生型C57B1/6小鼠

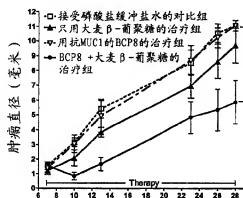


图 17A

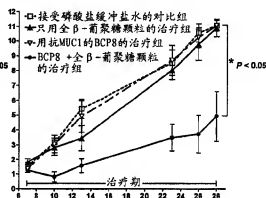


图 17B

CR-/-C57B1/6小鼠

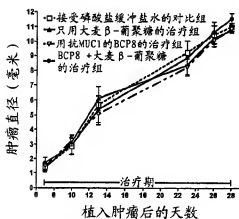


图 17C

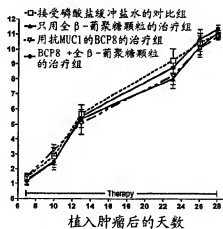


图 17D

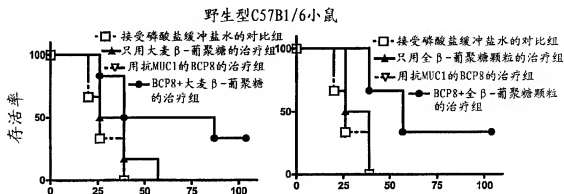


图 18A

图 18B

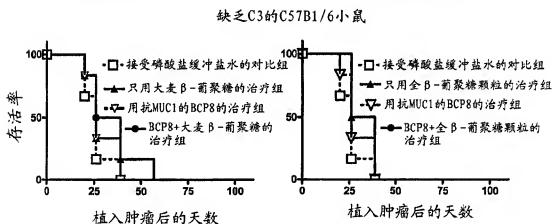


图 18C

图 18D

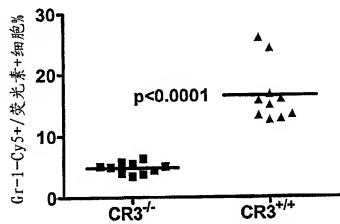


图 19